

## 明 細 書

### ヒトインスリン様成長因子に対する遺伝子組換え抗体

#### 技術分野

本発明は、ヒトインスリン様成長因子-I（以下、hIGF-I と記す）およびヒトインスリン様成長因子-II（以下、hIGF-II と記す）と特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の生物活性を阻害する能力を有する遺伝子組換え抗体または該抗体断片、該抗体または該抗体断片を生産する形質転換体、該抗体または該抗体断片の製造法および該抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬に関する。

#### 背景技術

IGF は、乳房、前立腺、肺、結腸などの器官の上皮系細胞の増殖、分化、細胞死（アポトーシス）の制御に重要な役割を果たしており、その生物活性は、IGF 受容体(IGF receptor; 以下、IGF-R と表記する)を介在する(Endocrine Reviews, 16, 3, 1995)。また、IGF の代謝を抑制されているだけでなく、IGF の運搬および IGF の受容体への結合を制御している 10 種類の IGF 結合蛋白質(IGF-binding protein; 以下、IGFBP と表記する)が存在する(Journal of Biological Chemistry, 264, 11843, 1989)。

IGF には、一本鎖のポリペプチドからなる IGF-I と IGF-II の 2 種類が存在し、いずれもインスリンの前駆体であるプロインスリンとアミノ酸レベルで約 40% の相同性を有している(Advances in Cancer Research, 68, 183, 1996)。生体内では、インスリン受容体、IGF-I 受容体(以下、IGF-IR と表記する)、IGF-II 受容体(以下、IGF-IIR と表記する)、およびインスリン受容体と IGF-IR のハイブリッド受容体が、IGF の受容体として機能している。

インスリン受容体および IGF-IR は、いずれもチロシンキナーゼ型受容体であり(Endocrine Reviews, 16, 143, 1995、Breast Cancer Research & Treatment,

47, 235, 1998)、両者のアミノ酸レベルでの相同性は約 60%である。インスリン受容体および IGF-IR は、それぞれの特有のリガンドであるインスリンおよび IGF-I に対して高い結合特異性を有するが、インスリン、IGF-I あるいは IGF-II のそれぞれとも結合性を有する (Journal of Biological Chemistry, 263, 11486, 1988、Journal of Biological Chemistry, 268, 7393, 1993)。また、インスリン受容体と IGF-IR の各サブユニットからなるハイブリッド受容体は、インスリンよりも IGF-I に対して高い結合特異性を有しており、IGF-IR として機能していると考えられているが、生体内での役割は不明である (Endocrine Reviews, 16, 3-34, 1995、Endocrine Reviews, 16, 143, 1995)。IGF-IIR は、IGF ファミリーのうち IGF-II とのみ結合できるが、チロシンキナーゼ活性を有していないため IGF-II のアンタゴニストとして機能していると考えられている

(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94, 12981, 1997)。以上のように、2 種の IGF は、これら 4 種の受容体に加え、10 種の IGF 結合蛋白質 (以下、IGFBP と表記する) と複雑なネットワークを形成し、生体内で機能している。

IGF は、肉腫、白血病、前立腺癌、乳癌、肺癌、結腸癌、胃癌、食道癌、肝臓癌、膵臓癌、腎臓癌、甲状腺癌、脳腫瘍、卵巣癌、子宮癌等の多種類の癌で発現が認められており、これらの癌細胞に対して強い増殖促進作用を示すことが知られている (British Journal of Cancer, 65, 311, 1992、Anticancer Research, 11, 1591, 1991、Annals of Internal Medicine, 122, 54, 1995、Oncology, 54, 502, 1997、Endocrinology, 137, 1764, 1996)。また、転移性の高い癌では、転移性の低い癌よりも IGF-II および IGF-IR の発現が高いことが知られており (International Journal of Cancer, 65, 812, 1996)、癌の転移にも IGF の関与が示唆されている。IGF の細胞増殖促進作用は、主に IGF-IR を介した作用であるが (Endocrinology, 136, 4298, 1995、Oncogene, 28, 6071, 1999)、一部の乳癌細胞では、IGF-II がインスリン受容体を介して作用することも知られている (Oncogene, 18, 2471, 1999)。

臨床的および疫学的な検討においても、乳癌(Cancer Epidemiology, Biomarkers & Preventions, 11, 1566, 2002、European Journal of Cancer, 29A, 492, 1993)、神経膠腫、肺癌 (Journal of the National Cancer, Insitute, 92, 737, 2000)、大腸癌 (Gut, 44, 704, 1999)、前立腺癌(Cancer Research, 62, 2942, 2002、Science, 279, 563, 1998)、卵巣癌(International Journal of Cancer, 101, 549, 2002)、膀胱癌 (Journal of Urology, 169, 714, 2003) および骨肉腫などの多くの癌組織における IGF あるいは IGF-IR、または血清 IGF 量の増加が報告されている (Journal of the National Cancer Institute, 92, 1472, 2000)。更に、IGF-IR が発現している癌患者は、予後が不良となることが報告されている (Cancer Research, 57, 3079, 1997)。

また、細胞死誘導活性を有するインターフェロンあるいは腫瘍壊死因子により誘導される大腸癌細胞の細胞死は、IGF-I により抑制されることが知られている。また、多形膠芽腫患者由来の初代培養細胞では、放射線感受性の癌細胞と比較して、放射線耐性の癌細胞では IGF-IR およびリン酸化 IGF-IR の発現量が増大していること、更に放射線感受性の癌細胞の上皮増殖因子受容体の機能を阻害した場合、IGF-IR の発現量が増大することが知られている。以上のことから、IGF は癌細胞の増殖促進効果だけでなく、IGF-IR を介して癌細胞のサバイバルシグナルを増強し、癌細胞の薬剤耐性取得にも関与している (Journal of the National Cancer Institute, 93, 1852, 2001、Oncogene, 20, 1913, 2001、Cancer Research, 60, 2007, 2000、Cancer Research, 62, 200, 2002)。

さらに、癌以外の疾患でも、IGF の関与が示唆されている疾患が報告されている。巨人症、末端肥大症では成長ホルモンの異常分泌により、二次的に IGF が異常発現し、病態の亢進に関与していると考えられている (Growth hormone & IGF Research, 13, 98, 2003)。また、糖尿病性合併症 (Science, 276, 1706, 1997、American Journal of Physiology, 274, F1045, 1998)、リウマチ性関節炎の病態形成にも IGF-I の関与が示唆されている (Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81, 150, 1996、Arthritis & Rheumatism, 39, 1556,

1996)。

モデル動物を用いた研究においても、IGF と種々の疾患の関係が検討されている。ヒト前立腺癌細胞移植モデルマウスでは、アンドロゲン非依存性増殖能の獲得に伴い、IGF-I および IGF-IR の発現が上昇することが知られている (Cancer Research, 61, 6276, 2001)。また、血清中の IGF の大部分は肝臓で生産されるが、肝臓でのみ IGF-I を欠損したマウスでは同所移植した大腸癌の増殖が抑制されることから、血清中の IGF が腫瘍増殖に関与していることも知られている (Cancer Research, 62, 1030, 2002)。IGF を体内局所に発現させたマウスでは、腫瘍の出現あるいは過形成が認められる (Oncogene, 22, 853, 2003、Cancer Reserch, 60, 1561, 2000、Journal of Biological Chemistry, 269, 13779, 1994)。

以上のように、IGF、IGF-R および IGFBP は癌の発生、増殖、および転移だけでなく、末端肥大症、糖尿病性合併症やリウマチ性関節炎などにおいても重要な役割を果たしている。

これまでに、IGF と IGF-R 間のシグナル伝達を阻害することによる抗腫瘍効果が検討されており、IGF-IR を標的とした抗 IGF-IR 抗体 (Cancer Research, 63, 5073, 2003、WO02/53596)、IGF-R 阻害剤 (WO99/28347)、あるいは血清中の IGF を抑制できる IGFBP が動物モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことが報告されている (Cancer research, 62, 3530, 2002)。

しかし、抗 IGF-IR 抗体では、マウスに移植されたエストロゲン非依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着は阻害するものの、エストロゲン依存性増殖を示すヒト乳癌細胞の生着や生着したヒト乳癌細胞の増殖は抑制されないことが示されており、IGF-IR の作用阻害のみでは、十分な抗腫瘍効果が得られないことが示されている (Breast Cancer Research & Treatment, 22, 101, 1992)。

IGF に対する抗体 (以下、抗 hIGF 抗体と表記する) としては、種々の抗体が知られている。代表的なヒト IGF-I に対する抗体 (以下、抗 hIGF-I 抗体と表記する) としては抗 hIGF-I マウス抗体 sm1.2 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81, 2389, 1984) が、あるい

はヒト IGF-II に対する抗体（以下、抗 hIGF-II 抗体と表記する）としては、抗 hIGF-II マウス抗体 S1F2 (Endocrinology, 124, 870, 1989) があげられる。sm1.2 は、IGF-II に対して 40%の、S1F2 は hIGF-I に対して 10%程度の交差反応性を有しており、両抗体ともそれぞれ in vitroでの hIGF-I あるいは hIGF-II 依存性の細胞増殖を阻害できることが知られている。

ヒト以外の動物の抗体、例えばマウス抗体をヒトに投与すると、マウス抗体が異物として認識されることにより副作用を惹起するばかりか、投与抗体の消失が早く治療上有用ではない。これらの問題点を解決するため、遺伝子組換え技術を利用してヒト以外の動物の抗体をヒト型キメラ抗体あるいはヒト型相補性決定領域（以下、CDR と表記する）移植抗体などのヒト化抗体にすることが試みられている。ヒト型キメラ抗体とは、抗体の可変領域（以下、V 領域と表記する）がヒト以外の動物の抗体で、定常領域（以下、C 領域と表記する）がヒト抗体である抗体であり (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81, 6851, 1984)、ヒト型 CDR 移植抗体とは、ヒト以外の動物の抗体の V 領域中の CDR のアミノ酸配列をヒト抗体の適切な位置に移植した抗体である (Nature, 321, 522, 1986)。これらのヒト化抗体は、マウス抗体などのヒト以外の動物の抗体に比較してヒトへの臨床応用上、様々な利点を有している。例えば、免疫原性および血中での安定性に関しては、ヒト型キメラ抗体では、ヒトに投与した場合、マウス抗体に比べて血中半減期が約 6 倍伸びたことが報告されている (European Journal of Cancer, 29A, 492, 1993)。ヒト型 CDR 移植抗体においても、サルを用いた実験でマウス抗体に比べ免疫原性が低下し、血中半減期が延長したことが報告されている (Cancer Research, 56, 1118, 1996、Immunology, 85, 668, 1995)。即ち、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、副作用が少なく、その治療効果が長期間持続することが期待される。また、ヒト化抗体は、遺伝子組換え技術を利用して作製するため、様々な形態の分子として作製することができる。最近の蛋白質工学、遺伝子工学の進歩により、ヒト化抗体を含めた抗体から Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、

scFv (Science, 242, 423, 1988)、dsFv (Molecular Immunology, 32, 249, 1995)、CDR を含むペプチド (Journal of Biological Chemistry, 271, 2966, 1996) などのより分子量の小さい抗体断片の作製が可能となっている。これらの抗体断片は、完全な抗体分子に比べ分子量が小さい為、標的組織への移行性に優れている (Cancer Research, 52, 3402, 1992)。

### 発明の開示

本発明の目的は、IGF-I および IGF-II と特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の生物活性を阻害する能力を有する遺伝子組換え抗体または該抗体断片、該抗体または該抗体断片を生産する形質転換体、該抗体または該抗体断片の製造法および該抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬等を提供することにある。

本発明は以下の (1) ~ (28) に関する。

(1) ヒトインスリン様成長因子-I (IGF-I) およびヒトインスリン様成長因子-II (IGF-II) と特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の生物活性を阻害する能力を有する遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(2) ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に対する結合の強さが同程度である (1) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(3) バイオセンサーピアコアで測定されるヒト IGF-I およびヒト IGF-II に対する結合定数が  $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  以上である (1) または (2) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(4) 抗体分子のクラスが IgG である、(1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(5) 遺伝子組換え抗体がヒト IGF に対するモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の相補性決定領域 (CDR) を含む、(1) ~ (4) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(6) 遺伝子組換え抗体または抗体断片の VH の相補性決定領域 (CDR) 1、

CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7 で表される (5) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(7) 遺伝子組換え抗体または抗体断片の VL の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で表される (5) に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(8) 遺伝子組換え抗体または抗体断片の VH の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7 で表され、VL の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で表される (5) ~ (7) のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(9) 遺伝子組換え抗体または該抗体活性断片の VH が、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む (5) ~ (8) のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(10) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む (5) ~ (8) のいずれか 1 項に記載

の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(11) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列、および VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む (5) ~ (10) のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(12) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列、および VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくと



も1つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む(5)～(11)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(13) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号54で表されるアミノ酸配列のうち49番目のSer、77番目のAsn、84番目のAsn、93番目のVal、97番目のAla、98番目のArgから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつVLが、配列番号55で表されるアミノ酸配列のうち4番目のMet、9番目のSer、10番目のSer、11番目のLeu、15番目のVal、35番目のTyr、39番目のPro、42番目のAla、45番目のLeu、46番目のLeu、69番目のAsp、70番目のPhe、71番目のThr、82番目のPheから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む(5)～(11)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(14) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列を含む(5)～(8)または(12)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(15) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVLが配列番号27、28または29で表されるアミノ酸配列を含む請求項5～8または12のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(16) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号27、28または29で表されるアミノ酸配列を含む(5)～(8)、(12)、(14)または(15)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(17) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む(5)～(8)、(12)、(14)～(16)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(18) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号28で表されるアミノ酸配列を含む(5)

～(8)、(12)、(14)～(16)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(19) 遺伝子組換え抗体または該抗体断片のVHが配列番号26で表されるアミノ酸配列を含み、かつVLが配列番号29で表されるアミノ酸配列を含む(5)～(8)、(12)、(14)～(16)のいずれかに1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(20) 遺伝子組換え抗体がヒト型CDR移植抗体である(1)～(19)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

(21) 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(scFv)、二量体化可変領域(diabody)、ジスルフィド安定化可変領域(dsFv)およびCDRを含むペプチドから選ばれる抗体断片である(1)～(19)のいずれか1項に記載の抗体断片。

(22) (1)～(21)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片をコードするDNA。

(23) (22)に記載のDNAを含有する発現ベクター。

(24) (23)に記載の発現ベクターを導入して得られる形質転換体。

(25) (24)に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物中に(1)～(21)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該遺伝子組換え抗体または該抗体断片を単離し、精製する工程を含む、遺伝子組換え抗体または該抗体断片を製造する方法。

(26) (1)～(21)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬。

(27) (1)～(21)のいずれか1項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を有効成分として含有するIGF関連疾患の治療薬。

(28) IGF関連疾患が、癌、末端肥大症および糖尿病性合併症である(27)に記載の治療薬。

本発明の遺伝子組換え抗体または該抗体断片としては、hIGF-I および hIGF-II と特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の生物学的活性を阻害する遺伝子組換え抗体または該抗体断片であれば、いかなる遺伝子組換え抗体または該抗体断片も包含されるが、hIGF-I および hIGF-II に対する結合の強さが同程度である遺伝子組換え抗体または該抗体断片が好ましい。

本発明の hIGF-I および hIGF-II と特異的に結合できる遺伝子組換え抗体または該抗体断片は、例えば、hIGF-I に対するモノクローナル抗体で hIGF-II に対する交差反応性を有するモノクローナル抗体あるいは hIGF-II に対するモノクローナル抗体で hIGF-I に対する交差反応性を有するモノクローナル抗体から、遺伝子工学的手法を用いて作製することができる。

抗体の hIGF-I および hIGF-II に対する結合の強さが同程度であるとは、抗体が hIGF-I および hIGF-II に対して同程度の結合活性を有していることをいう。

結合活性は、公知の測定法により数値化することができる。公知の測定法としては、酵素免疫学的測定法（以下、ELISA 法と記す）や表面プラズモン共鳴の原理（Journal of Immunological Method、145, 229, 1991）などを利用したバイオセンサー法（以下、バイオセンサーピアコアと記す）などが用いられる。バイオセンサーピアコアによる測定は、2 分子間の結合と解離に伴うセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を光学現象により、SPR シグナルとして検出するものである。

ELISA 法による測定法としては、例えば、固相化した抗原に対して結合する抗体量を測定する ELISA 法で得られる IGF-I と IGF-II に対する結果を比較する方法や、同様の ELISA 法において抗体の反応時に抗原を同時に添加して、固相化した抗原に結合する抗体量の減少を測定する競合 ELISA 法（Antibodies ; A laboratory Manual, Cold Spring harbor Laboratory, Chapter 14, 1988）で得られる IGF-I と IGF-II に対する結果を比較する方法などによって、抗体の IGF-I および IGF-II の両者に対する結合活性を測定する方法などがあげられる。

抗体が hIGF-I および hIGF-II に対して同程度の結合活性を有していることと

は、上記の測定法により数値化された抗体の hIGF-I および hIGF-II に対する結合活性を比較して、抗体の hIGF-I に対する結合活性を 1 としたとき、hIGF-II に対する結合活性が 0.1~10、好ましくは 0.2~5、さらに好ましくは 0.5~2、最も好ましくは 1 であることをいう。

hIGF-I および hIGF-II 両者の生物活性を阻害する能力とは、hIGF-I または hIGF-II に特異的な受容体を介する hIGF-I および hIGF-II からのシグナル伝達を阻害して、hIGF-I および hIGF-II の持つ生物学的活性を阻害することなどがあげられ、例えば、hIGF-I および hIGF-II と、hIGF-I または hIGF-II に特異的な受容体との結合を阻害することがあげられる。このような抗体が持つ抗原の生物活性を阻害する活性は、抗体の中和活性ともいう。

hIGF-I および hIGF-II の持つ生物学的活性としては、hIGF-I または hIGF-II に特異的な受容体を介して、細胞の増殖を促進する活性などがあげられる。

hIGF-I または hIGF-II に特異的な受容体とは、hIGF-I または hIGF-II と結合することができる受容体をいい、IGF-I 受容体、IGF-II 受容体、インスリン受容体および IGF-I とインスリン受容体のハイブリッド受容体などがあげられる。

本発明の遺伝子組換え抗体または該抗体断片としては、hIGF-I および hIGF-II と特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有していればいかなる遺伝子組換え抗体または該抗体断片も包含されるが、バイオセンサーピアコアで測定されるヒト IGF-I およびヒト IGF-II に対する結合定数が好ましくは  $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上、より好ましくは  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上、さらに好ましくは  $3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上、最も好ましくは  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$  以上である遺伝子組換え抗体または該抗体断片が好適に用いられる。

本発明の遺伝子組換え抗体は、遺伝子工学的手法を用いて作製される抗体をいう。このような遺伝子組換え抗体としては、好ましくはヒト抗体の定常領域を含む遺伝子組換え抗体、より好ましくはヒト抗体の定常領域と可変領域のフレームワーク（以下、FR と記す）を含んでなる遺伝子組換え抗体が望ましい。このような遺伝子組換え抗体は、例えば、ヒト型キメラ抗体、ヒト型相補性決

定領域（以下、CDR と記す）移植抗体、遺伝子組換え非ヒト動物によって作製されたハイブリドーマより生産されるヒト抗体、遺伝子工学的手法を用いてモノクローン化されたヒト抗体などがあげられる。また、人為的に作製された抗体遺伝子ライブラリーから選抜された抗体の CDR を、適当なヒト抗体の FR などと連結させ、さらにヒト抗体の定常領域などと連結させて作製された遺伝子組換え抗体なども含まれる。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物の抗体重鎖可変領域（以下、可変領域は V 領域、重鎖は H 鎖として HV または VH と記す）および抗体軽鎖可変領域（以下、軽鎖は L 鎖として LV または VL と記す）とヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CH と記す）およびヒト抗体の軽鎖定常領域（以下、CL と記す）とからなる抗体を意味する。ヒト以外の哺乳動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどのハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ヒト型キメラ抗体は、モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、宿主細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

ヒト型キメラ抗体の CH としては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIg と表記する）に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$  および  $\gamma 4$  クラスといったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$  クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものをを用いることができる。

本発明のヒト型キメラ抗体としては、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有するヒト型キメラ抗体であればいかなるものでも含まれるが、具体的には抗 hIGF ラットモノクローナル

KM1468 (FERM BP-7978) を元に製造されるヒト型キメラ抗体、VH が配列番号 2 および／または VL が配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含むヒト型キメラ抗体、形質転換体 KM3002 (FERM BP-7996) により生産される抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 などがあげられる。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR をヒト抗体の VH および VL 中の適切な位置に移植して作製される抗体を意味する。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を、ヒト抗体の VH および VL の FR 配列に移植した V 領域のアミノ酸配列を設計し、該アミノ酸配列をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子を有する宿主細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主細胞へ導入することによりヒト型 CDR 移植抗体を発現させ、製造することができる。ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を、ヒト抗体の VH および VL の FR 配列に移植した V 領域アミノ酸配列は、数箇所の変異を導入した配列を設計してもよい。この様にして設計されたアミノ酸配列をコードする cDNA は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989、Current Protocols in Molecular Biology、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 488 (1985)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、取得することができる。置換されるアミノ酸の数は 1 個以上でありその数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異導入法等の周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数であり、例えば、1～数十個、好ましくは 1～20 個、より好ましくは 1～10 個、さらに好ましくは 1～5 個である。

ヒト型 CDR 移植抗体の CH としては、hIg に属すればいかなるものでもよいが、hIgG クラスのものが好適であり、更に hIgG クラスに属する  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$  および  $\gamma 4$  クラスといったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型

キメラ抗体の CL としては、hIg に属すればいかなるものでもよく、 $\kappa$ クラスあるいは  $\lambda$  クラスのものを用いることができる。

本発明のヒト型 CDR 移植抗体としては、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有するヒト型 CDR 移植抗体であればいかなるものでも含まれ、好ましくは抗ヒト IGF 抗体の VH および VL の CDR を含むヒト型 CDR 移植抗体、ラットハイブリドーマ KM1468 (FERM BP-7978) により生産される抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の VH および VL の CDR を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VH の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列番号 5、6、7 および／または抗体の VL の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列番号 8、9、10 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体などがあげられる。

これらのヒト型 CDR 移植抗体組成物のなかでも、抗体の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列および配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VL が配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列および配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体

の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列および配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列および配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体が好ましく、抗体の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番



目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体がより好ましい。

具体的には、抗体の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VL が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列、配列番号 28 で表されるアミノ酸配列または配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、抗体の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体、

抗体の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 28 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体および抗体の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ抗体の VL が配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を含むヒト型 CDR 移植抗体があげられる。

ヒト抗体としては、遺伝子組換え非ヒト動物から作製されたハイブリドーマより生産されるヒト抗体、あるいは遺伝子工学的手法を用いてモノクローン化されたヒト抗体などがあげられる。

本来ヒト抗体とは、天然にヒト体内に存在する抗体を示すが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩によりモノクローナルなヒト抗体の作製が可能となった。

本発明のヒト抗体としては、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有するヒト抗体であればいかなるものでも含まれるが、具体的には遺伝子工学的手法あるいは細胞工学的手法により、ヒト抗体産生細胞を作製し、該細胞により生産されたヒト抗体や、あるいはヒト抗体産生トランスジェニック非ヒト動物から通常のハイブリドーマ作製法により得られたモノクローナル抗体などが含まれる。

遺伝子工学的手法によりヒト抗体産生細胞を作製する方法としては、例えば、ヒト B 細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することにより Fab (Fragment of antigen binding)、一本鎖抗体等の抗体断片をファージ表面に発現させたヒト抗体ファージライブラリーを作製し、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を発現しているファージを回収する方法があげられる。該抗体断片は、更に蛋白質工学的手法により、2 本の完全な H 鎖および 2 本の完全な L 鎖からなるヒト抗体分子へも変換する方法などがあげられる。

細胞工学的手法によりヒト抗体産生細胞を作製する方法としては、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、EB ウイルスなどを感染させて不死化させた後、限界希釈法によるクローニングを経て、該抗体を生産する継代培養が可能なり

ンパ球を単離する方法があげられる。該リンパ球を培養し、該培養物中より目的の抗体を精製し、取得する方法などがあげられる。

人為的に作製された抗体遺伝子ライブラリーから選抜された抗体の CDR を、適当なヒト抗体の FR などと連結させ、さらにヒト抗体の定常領域などと連結し、遺伝子組換え抗体を作製する場合の人為的抗体遺伝子ライブラリーとしては、抗体産生細胞の集団から作製された抗体遺伝子ライブラリーや、該抗体遺伝子ライブラリーに無作為変異を導入してライブラリーのレパートリーが増大された抗体遺伝子ライブラリーなどが含まれる。

本発明の抗体断片としては、上記抗体の可変領域の一部あるいは全部を含み、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体活性断片などが含まれる。抗体断片としては、以下に示す、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、diabody、dsFv、CDR を含むペプチドなどがあげられる。

Fab は、IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 224 番目のアミノ酸残基で切断される)、H 鎖の N 末端側約半分と L 鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体を蛋白質分解酵素パパインで処理して得ることができる。または、該抗体の Fab をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub> は、IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得られる断片のうち (H 鎖の 234 番目のアミノ酸残基で切断される)、Fab がヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されたものよりやや大きい、分子量約 10 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の  $F(ab')_2$  は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体を蛋白質分解酵素ペプシンで処理して得ることができる。または、下記の Fab' をチオエーテル結合あるいはジスルフィド結合させ、作製することができる。

Fab' は、上記  $F(ab')_2$  のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の Fab' は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する  $F(ab')_2$  を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab' 断片をコードする DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、Fab' を製造することができる。

scFv は、1 本の VH と 1 本の VL とを適当なペプチドリンカー（以下、P と記す）を用いて、VH-P-VL ないしは VL-P-VH の順で連結されたポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

本発明の scFv は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、scFv を製造することができる。

diabody は、scFv が二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。diabody が持つ二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

本発明の diabody は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体の VH および VL をコードする cDNA を取得し、scFv をコードする DNA を P のアミノ酸配列の長さが 8 残基以下となるように構築し、該 DNA を原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベ

クターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、diabodyを製造することができる。

dsFvは、VHおよびVL中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基はReiterらにより示された方法(Protein Engineering, 7, 697-704, 1994)に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

本発明のdsFvは、hIGF-IおよびhIGF-IIに特異的に結合し、hIGF-IおよびhIGF-IIの機能を阻害する能力を有する抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、dsFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、dsFvを製造することができる。

CDRを含むペプチドは、VHまたはVLのCDRの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のCDRを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。

本発明のCDRを含むペプチドは、hIGF-IおよびhIGF-IIに特異的に結合し、hIGF-IおよびhIGF-IIの機能を阻害する能力を有する抗体のVHおよびVLのCDRをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターあるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、CDRを含むペプチドを製造することができる。

また、CDRを含むペプチドは、Fmoc法(フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc法(t-ブチルオキシカルボニル法)などの化学合成法によって製造することもできる。

本発明の抗体は、本発明の抗体および抗体断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを遺伝子工学的あるいは化学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

本発明の遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体は、hIGF-IおよびhIGF-II

に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体および抗体断片をコードする DNA と、結合させたい蛋白質をコードする DNA を連結させて発現用ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明の化学的に結合させた抗体の誘導体は、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有する抗体および抗体断片の H 鎖あるいは L 鎖の N 末端側あるいは C 末端側、抗体および抗体断片中の適当な置換基あるいは側鎖、さらには抗体および抗体断片中の糖鎖などに放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質などを化学的手法（抗体工学入門、金光修著、地人書館、1994）により結合させることにより製造することができる。

放射性同位元素としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$  などがあげられ、例えば、クロラミン T 法などにより抗体に結合させることができる。

低分子の薬剤としては、ナイトロジェン・マスタード、サイクロフォスファミドなどのアルキル化剤、5-フルオロウラシル、メソトレキセートなどの代謝拮抗剤、ダウノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン C、ダウノルピシン、ドキソルピシンなどの抗生物質、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシンのような植物アルカロイド、タモキシフェン、デキサメタゾンなどのホルモン剤などの抗癌剤（臨床腫瘍学、日本臨床腫瘍研究会編、癌と化学療法社、1996）、またはヒドロコチゾン、プレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン、インドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート、ベニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド、アザチオプリンなどの免疫抑制剤、マレイン酸クロルフェニラミン、クレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤（炎症と抗炎症療法、医歯薬出版株式会社、1982）などがあげられる。例えば、ダウノマイシンと抗体を結合させる方法としては、グルタルアルデヒドを介してダウノマイシンと抗体のアミノ基間を結合させる方法、水溶性カルボジイミドを介してダウノマイシンのアミノ基と抗体のカルボキシル基を結

合させる方法などがあげられる。

高分子の薬剤としては、ポリエチレングリコール（以下、PEG と記す）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどがあげられる。これらの高分子化合物を抗体および抗体断片に結合させることにより、（1）化学的、物理的あるいは生物的な種々の因子に対する安定性の向上、（2）血中半減期の顕著な延長、（3）免疫原性の消失、抗体産生の抑制、などの効果が期待される（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。例えば、PEG と抗体を結合させる方法としては、PEG 化修飾試薬と反応させる方法などがあげられる（バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店、1993）。PEG 化修飾試薬としては、リジンの  $\epsilon$ -アミノ基の修飾剤（特昭 61-178926）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基の修飾剤（特昭 56-23587）、アルギニンのグアニジノ基の修飾剤（特平 2-117920）などがあげられる。

蛋白質としては、免疫担当細胞を活性化するサイトカイン、例えば、ヒトインターロイキン 2（以下、hIL-2 と記す）、ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（以下、hGM-CSF と記す）、ヒトマクロファージコロニー刺激因子（以下、hM-CSF と記す）、ヒトインターロイキン 12（以下、hIL-12 と記す）などがあげられる。また、癌細胞を直接障害する活性を有するリシンやジフテリア毒素などの毒素を用いることができる。例えば、蛋白質との融合抗体については、抗体および抗体断片をコードする cDNA と蛋白質をコードする cDNA を連結させた融合抗体をコードする DNA を構築し、該 DNA を原核生物あるいは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物あるいは真核生物へ導入することにより発現させ、融合抗体を製造することができる。

以下に、hIGF-I および hIGF-II に特異的に結合し、かつ、hIGF-I および hIGF-II の機能を阻害する能力を有するヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の作製方法、該抗体断片の作製方法、ならびにそれらの活性の評価方法、および本発明のヒト化抗体または該抗体断片の使用方法について説明する。

## 1. ヒト化抗体の作製

### (1) ヒト化抗体発現用ベクターの構築

ヒト化抗体発現用ベクターとしては、ヒト抗体の CH および／または CL をコードする遺伝子が組み込まれた抗体発現用ベクターは、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の CH および CL であることができ、例えば、ヒト抗体の H 鎖の IgG1 サブクラスの C 領域（以下、hC $\gamma$ 1 と記す）およびヒト抗体の L 鎖の  $\kappa$  クラスの C 領域（以下、hC $\kappa$  と記す）などがあげられる。ヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子としてはエキソンとイントロンからなる染色体 DNA あるいは cDNA を用いることもできる。

動物細胞用発現ベクターとしては、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、pAGE107 (Cytotechnology, 3, 133, 1990)、pAGE103 (Journal of Biochemistry, 101, 1307, 1987)、pHSG274 (Gene, 27, 223, 1984)、pKCR (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78, 1527, 1981)、pSG1 $\beta$ d2-4 (Cytotechnology, 4, 173, 1990) などがあげられる。動物細胞用発現ベクターに用いるプロモーターとエンハンサーとしては、SV40 の初期プロモーターとエンハンサー (Journal of Biochemistry, 101, 1307, 1987)、モロニーマウス白血病ウイルスの LTR プロモーターとエンハンサー (Biochemical & Biophysical Research Communications, 149, 960, 1987)、イムノグロブリン H 鎖のプロモーター (Cell, 41, 479, 1985) とエンハンサー (Cell, 33, 717, 1983) などがあげられる。

ヒト化抗体発現用ベクターは、抗体 H 鎖および L 鎖が別々のベクター上に存在するタイプあるいは同一のベクター上に存在するタイプ（以下、タンデム型と記す）のどちらでも用いることができるが、ヒト化抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体 H 鎖および L 鎖の



発現量のバランスが均衡するなどの点からタンデム型のヒト化抗体発現用ベクターの方が好ましい (Journal of Immunological Methods, 167, 271, 1994)。タンデム型のヒト化抗体発現用ベクターとしては、pKANTEX93 (WO97/10354)、pEE18 (Hybridoma, 17, 559, 1998) などがあげられる。

構築したヒト化抗体発現用ベクターは、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体の動物細胞での発現に使用できる。

(2) ヒト以外の動物の抗体の V 領域をコードする cDNA の取得およびアミノ酸配列の解析

ヒト以外の動物の抗体、例えば、マウス抗体の VH および VL をコードする cDNA は以下のようにして取得する。

マウス抗体などを産生するハイブリドーマより mRNA を抽出し、cDNA を合成する。合成した cDNA をファージあるいはプラスミドなどのベクターにクローニングして cDNA ライブラリーを作製する。該ライブラリーより、マウス抗体の C 領域部分あるいは V 領域部分をプローブとして用い、VH をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドおよび VL をコードする cDNA を有する組換えファージあるいは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージあるいは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体の VH および VL の全塩基配列を決定し、塩基配列より VH および VL の全アミノ酸配列を推定する。

ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなど、ハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができる。

ハイブリドーマから全 RNA を調製する方法としては、チオシアン酸グアニジンートリフルオロ酢酸セシウム法 (Methods in Enzymology, 154, 3, 1987)、また全 RNA から mRNA を調製する方法としては、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) などがあげられる。また、ハイブリドーマから mRNA を調製するキットとしては、Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製)、

Quick Prep mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia 社製) などがあげられる。

cDNA の合成および cDNA ライブラリー作製法としては、常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34)、あるいは市販のキット、例えば、Super Script™ Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (GIBCO BRL 社製)、ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene 社製) や TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham-Pharmacia 社製) を用いる方法などがあげられる。

cDNA ライブラリーの作製の際、ハイブリドーマから抽出した mRNA を鋳型として合成した cDNA を組み込むベクターは、該 cDNA を組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express (Stratagene, 5, 58, 1992)、pBluescript II SK(+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989)、λZAP II (Stratagene 社製)、λgt10、λgt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, I, 49, 1985)、Lambda BlueMid (Clontech 社製)、λExCell、pT7T3 18U (Amersham-Pharmacia 社製)、pcD2 (Molecular & Cellular Biology, 3, 280, 1983) および pUC18 (Gene, 33, 103, 1985) などのファージあるいはプラスミドベクターが用いられる。

ファージあるいはプラスミドベクターにより構築される cDNA ライブラリーを導入する大腸菌としては該 cDNA ライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF'

(Journal of Biotechnology, 23, 271, 1992)、C600 (Genetics, 59, 177-190, 1968)、Y1088、Y1090 (Science, 222, 778, 1983)、NM522 (Journal of Molecular Biology, 166, 1, 1983)、K802 (Journal of Molecular Biology, 16, 118, 1966) および JM105 (Gene, 38, 275, 1985) などが用いられる。

cDNA ライブラリーからのヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA クローンの選択法としては、放射性同位元素あるいは蛍光標識、あるいは

酵素標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法あるいは  
ブランク・ハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual,  
Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) により選択することができる。  
また、プライマーを調製し、mRNA から合成した cDNA あるいは cDNA ライブ  
ラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction (以下、PCR 法と記す; Molecular  
Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989;  
Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34) により VH およ  
び VL をコードする cDNA を調製することもできる。

上記方法により選択された cDNA を、適当な制限酵素等で切断後、pBluescript  
SK(-) (Stratagene 社製) などのプラスミドベクターにクローニングし、通常用  
いられる塩基配列解析方法、例えば、ジデオキシ法 (Proceedings of the National  
Academy of Sciences of the United States of America, 74, 5463, 1977) な  
どの反応を行い、塩基配列自動分析装置、例えば、塩基配列自動分析装置 ABI  
PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) などを用いて解析することで該 cDNA の  
塩基配列を決定することができる。

決定した塩基配列から VH および VL の全アミノ酸配列を推定し、既知の抗体  
の VH および VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological  
Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することによ  
り、取得した cDNA が分泌シグナル配列を含む抗体の VH および VL の完全なアミ  
ノ酸配列をコードしているかを確認することができる。分泌シグナル配列を含  
む抗体の VH および VL の完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体の VH およ  
び VL の全アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest,  
US Dept. Health and Human Services, 1991) と比較することにより、分泌シ  
グナル配列の長さおよび N 末端アミノ酸配列を推定でき、さらにはそれらが属  
するサブグループを知ることができる。また、VH および VL の各 CDR のアミノ酸  
配列についても、既知の抗体の VH および VL のアミノ酸配列 (Sequences of  
Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services,

1991) と比較することによって見出すことができる。

さらに、VH および VL の完全なアミノ酸配列を用いて任意のデータベース、例えば、SWISS-PROT や PIR-Protein などに対して BLAST 法 (Journal of Molecular Biology, 215, 403-410, 1990) などの配列の相同性検索を行い、配列の新規性を検討することができる。

### (3) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。例えば、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の 3' 末端側の塩基配列とヒト抗体の CH および CL の 5' 末端側の塩基配列とから成り、かつ適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成 DNA とそれぞれ連結し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。また、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL をコードする cDNA を含むプラスミドを鋳型として、5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を有するプライマーを用いて PCR 法により VH および VL をコードする cDNA を増幅し、それぞれを上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

### (4) ヒト型 CDR 移植抗体の V 領域をコードする cDNA の構築

ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA は、以下のようにして構築することができる。まず、目的のヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR のアミノ酸配列を移植するヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列を選択する。ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列としては、ヒト抗体由来のものであれば、いかなるものでも用いることができる。例えば、Protein Data

Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列、ヒト抗体のVHおよびVLのFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) などがあげられるが、その中でも、十分な活性を有するヒト型 CDR 移植抗体を作製するためには、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性 (少なくとも60%以上) を有するアミノ酸配列を選択することが望ましい。次に、選択したヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列に目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を移植し、ヒト型 CDR 移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列を設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮して塩基配列に変換し、ヒト型 CDR 移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を設計する。設計した塩基配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらをPCR法により連結する。この場合、PCRでの反応効率および合成可能なDNAの長さから、VH、VLとも4~6本の合成DNAを設計することが好ましい。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記2(1)で構築したヒト化抗体発現用ベクターに容易にクローニングすることができる。PCR反応による連結後、PCR産物をpBluescript SK(-) (Stratagene社製)などのプラスミドにクローニングし、上記2(2)に記載の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型 CDR 移植抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミドクローンを取得する。

#### (5) ヒト型 CDR 移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型 CDR 移植抗体は、目的のヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元のヒト以外の動物の抗体に比べて低下してしまうことが知られている

(BIO/TECHNOLOGY, 9, 266, 1991)。この原因としては、元のヒト以外の動物の抗体の VH および VL では、CDR のアミノ酸残基のみならず、FR のいくつかのアミノ酸残基が直接的あるいは間接的に抗原結合活性に関与している。CDR の移植時には、それらアミノ酸残基がヒト抗体の VH および VL の FR に由来するアミノ酸残基へと変化してしまうことが考えられている。このため、ヒト型 CDR 移植抗体では、ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDR のアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、抗体の立体構造を維持するアミノ酸残基および間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらを CDR の由来となったヒト以外の動物の抗体配列中に見出されるアミノ酸残基に改変し、低下した抗原結合活性を上昇させることが行われている (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266, 1991)。ヒト型 CDR 移植抗体の作製においては、それら抗原結合活性に関わる FR のアミノ酸残基を如何に効率よく同定するかが、最も重要な点であり、そのために X 線結晶解析 (Journal of Molecular Biology, 112, 535, 1977) あるいはコンピューターモデリング (Protein Engineering, 7, 1501, 1994) などによる抗体の立体構造の構築および解析が行われている。これら抗体の立体構造の情報は、ヒト型 CDR 移植抗体の作製に多くの有益な情報をもたらして来たが、その一方、あらゆる抗体に適応可能なヒト型 CDR 移植抗体の作製法は未だ確立されておらず、現状ではそれぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討するなどの種々の試行錯誤が必要である。

ヒト抗体の VH および VL の FR のアミノ酸残基の改変は、改変用合成 DNA を用いて上記 2 (4) に記載の PCR 法を行うことにより、達成できる。PCR 後の増幅産物について上記 2 (2) に記載の方法により、塩基配列を決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

#### (6) ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターの構築

上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流に、上記 2 (4) および (5) で構築したヒト型 CDR 移植

抗体の VH および VL をコードする cDNA をクローニングし、ヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築することができる。

例えば、上記 2 (4) および (5) でヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL を構築する際に用いる合成 DNA のうち、両端に位置する合成 DNA の 5' 末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、上記 2 (1) に記載のヒト化抗体発現用ベクターのヒト抗体の CH および CL をコードする遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにクローニングすることができる。

#### (7) ヒト化抗体の一過性発現

作製した多種類のヒト化抗体の抗原結合活性を効率的に評価するために、上記 2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクター、あるいはそれらを改変した発現ベクターを用いてヒト化抗体の一過性発現を行うことができる。発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、その発現量の高さから、サル腎臓由来細胞株 COS-7 細胞 (ATCC CRL1651) が一般に用いられる (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)。COS-7 細胞への発現ベクターの導入法としては、DEAE-デキストラン法 (Methods in Nucleic Acids Research, CRC press, 283, 1991)、リポフェクション法 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 7413, 1987)、発現ベクターの導入後、培養上清中のヒト化抗体の発現量及び抗原結合活性は ELISA (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) などにより測定できる。

#### (8) ヒト化抗体の安定発現

上記 2 (3) および (6) に記載のヒト化抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することによりヒト化抗体を安定に発現する形質転換細胞を得ることができる。

宿主細胞への発現ベクターの導入法としては、エレクトロポレーション法

(Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) などがあげられる。

ヒト化抗体発現ベクターを導入する宿主細胞としては、ヒト化抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、マウス SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC CRL1581)、マウス P3X63-Ag8.653 細胞 (ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfr と表記する) が欠損した CHO 細胞 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 4216-4220, 1980)、ラット YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL1662、以下、YB2/0 細胞と表記する) などがあげられる。

発現ベクターの導入後、ヒト化抗体を安定に発現する形質転換体は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、G418 sulfate (以下、G418 と記す) などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択できる。動物細胞培養用培地としては、RPMI1640 培地 (日水製薬社製)、GIT 培地 (日本製薬社製)、EX-CELL302 培地 (JRH 社製)、IMDM (GIBCO BRL 社製)、Hybridoma-SFM (GIBCO BRL 社製)、またはこれら培地にウシ胎児血清などの各種添加物を添加した培地などを用いることができる。得られた形質転換細胞を培地中で培養することで培養上清中にヒト化抗体を発現蓄積させることができる。培養上清中のヒト化抗体の発現量および抗原結合活性は、ELISA により測定できる。また、形質転換細胞は、特開平 2-257891 に開示されている方法に従い、dhfr 増幅系などを利用してヒト化抗体の発現量を上昇させることができる。

ヒト化抗体は、形質転換細胞の培養上清よりプロテイン A カラムを用いて精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 8, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996)。また、その他に通常、蛋白質の精製で用いられる精製方法を使用することができる。例えば、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過等を組み合わせて行い、精製することができる。精製したヒト化抗体の H 鎖、L 鎖あるいは抗体分子全体の分子量は、



ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、PAGE と表記する: Nature, 227, 680-685, 1970) やウエスタンブロッティング法 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 12, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) など測定することができる。

## 2. 抗体断片の作製

抗体断片は、上記 1 および 2 に記載の抗 hIGF 抗体をもとに遺伝子工学的手法あるいは蛋白質化学的手法により、作製することができる。

遺伝子工学的手法としては、目的の抗体断片をコードする遺伝子を構築し、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、大腸菌などの適当な宿主を用いて発現、精製を行うなどの方法があげられる。

蛋白質化学的手法としては、ペプシン、パパインなどの蛋白質分解酵素を用いた部位特異的切断、精製などの方法があげられる。

抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、scFv、diabody、dsFv、CDR を含むペプチドなどがあげられる。

### (1) Fab の作製

Fab は、蛋白質化学的には IgG を蛋白質分解酵素パパインで処理することにより、作製することができる。パパインの処理後は、元の抗体がプロテイン A 結合性を有する IgG サブクラスであれば、プロテイン A カラムに通すことで、IgG 分子や Fc 断片と分離し、均一な Fab として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995)。プロテイン A 結合性を持たない IgG サブクラスの抗体の場合は、イオン交換クロマトグラフィーにより、Fab は低塩濃度で溶出される画分中に回収することができる

(Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, 1995)。

また、Fab は遺伝子工学的には、多くは大腸菌を用いて、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab 発現用ベクターにク

ローニングし、Fab 発現ベクターを作製することができる。Fab 発現用ベクターとしては、Fab をコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pIT106 (Science, 240, 1041, 1988) などがあげられる。Fab 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに Fab を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、培養上清中に活性を持った Fab が漏出する。

リフォールディング後あるいは培養上清からは、抗原を結合させたカラムを用いることにより、均一な Fab を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Guide, W. H. Freeman and Company, 1992)。

## (2) $F(ab')_2$ の作製

$F(ab')_2$  は、蛋白質化学的には IgG を蛋白質分解酵素ペプシンで処理することにより、作製することができる。ペプシンの処理後は、Fab と同様の精製操作により、均一な  $F(ab')_2$  として回収することができる (Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, third edition, Academic Press, 1995)。また、下記 3 (3) に記載の Fab' を o-PDM やビスマレイミドヘキサンなどのようなマレイミドで処理し、チオエーテル結合させる方法や、DTNB [5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] で処理し、S-S 結合させる方法によっても作製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

## (3) Fab' の作製

Fab' は、上記 3 (2) に記載の  $F(ab')_2$  をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、Fab' は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、Fab' 発現用ベクターにクローニングし、Fab' 発現ベクターを作製することができる。Fab' 発現用ベクターとしては、Fab' をコードする DNA を組み込み発現できるも

のであればいかなるものも用いることができる。例えば Fab' 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに Fab' を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある Fab' とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収させることができるリフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、プロテイン G カラムなどを用いることにより、均一な Fab' を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (4) scFv の作製

scFv は遺伝子工学的には、ファージまたは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の V 領域をコードする DNA を、scFv 発現用ベクターにクローニングし、scFv 発現ベクターを作製することができる。scFv 発現用ベクターとしては、scFv をコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Amersham-Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies & Hybridomas, 5, 48, 1994) などがあげられる。scFv 発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、ヘルパーファージを感染させることで、ファージ表面に scFv がファージ表面蛋白質と融合した形で発現するファージを得ることができる。また、scFv 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある scFv とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (5) diabody の作製

diabody は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。例えば、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の VH と VL をリンカーがコードするアミノ酸残基が 8 残基以下となるように連結した DNA を作製し、diabody 発現用ベクターにクローニングし、diabody 発現ベクターを作製することができる。diabody 発現用ベクターとしては、diabody をコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pCANTAB5E (Amersham Pharmacia 社製)、pHFA (Human Antibodies Hybridomas, 5, 48, 1994) などがあげられる。diabody 発現ベクターを導入した大腸菌の封入体あるいはペリプラズムに diabody を生成蓄積させることができる。封入体からは、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある diabody とすることができ、また、ペリプラズムに発現させた場合は、リゾチームによる部分消化、浸透圧ショック、ソニケーションなどの処理により菌を破碎し、菌体外へ回収することができる。リフォールディング後あるいは菌の破碎液からは、陽イオン交換クロマトグラフィーなどを用いることにより、均一な scFv を精製することができる (Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL PRESS, 1996)。

#### (6) dsFv の作製

dsFv は遺伝子工学的には、多くは大腸菌、また、昆虫細胞や動物細胞などを用いて作製することができる。まず、上記 2 (2)、2 (4) および 2 (5) に記載の抗体の VH および VL をコードする DNA の適当な位置に変異を導入し、コードするアミノ酸残基がシステインに置換された DNA を作製する。作製した各 DNA を dsFv 発現用ベクターにクローニングし、VH および VL の発現ベクターを作製することができる。dsFv 発現用ベクターとしては、dsFv をコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pULI9 (Protein Engineering, 7, 697, 1994) などがあげられる。VH および VL の発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに VH お

よび VL ポリペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズムから VH および VL ポリペプチドを得、混合し、通常蛋白質で用いられるリフォールディング法により、活性のある dsFv とすることができる。リフォールディング後は、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、さらに精製することができる (Protein Engineering, 7, 697, 1994)。

#### (7) CDR ペプチドの作製

CDR を含むペプチドは、Fmoc 法あるいは tBoc 法等の化学合成法によって作製することができる。また、CDR を含むペプチドをコードする DNA を作製し、作製した DNA を適当な発現用ベクターにクローニングし、CDR ペプチド発現ベクターを作製することができる。発現用ベクターとしては、CDR ペプチドをコードする DNA を組み込み発現できるものであればいかなるものも用いることができる。例えば、pLEX (Invitrogen 社製)、pAX4a+ (Invitrogen 社製) などがあげられる。

発現ベクターを適当な大腸菌に導入し、封入体あるいはペリプラズムに CDR ペプチドを生成蓄積させることができる。封入体あるいはペリプラズムから CDR ペプチドを得、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過などにより、精製することができる (Protein Engineering, 7, 697, 1994)。

### 3. ヒト化抗体または該抗体断片の活性評価方法

培養上清中あるいは精製した抗 hIGF ヒト化抗体の hIGF に対する結合活性は、ELISA 法およびバイオセンサーピアコアなどにより測定することができる。また、上記 1.(7) に示した hIGF 依存的な増殖を示す細胞株の *in vivo* あるいは *in vitro* の増殖に対する抗体の影響を検討することにより、hIGF の機能を阻害する本発明の抗体の活性を測定することができる。

#### (1) ELISA による活性評価

結合 ELISA とは、抗原を 96 ウェル ELISA プレートに固定化し、第一抗体として反応させ、第一抗体を認識することができる標識した二次抗体を反応させて、標識物を検出することにより、抗原と抗体との結合活性を測定する方法である。

具体的には、固定化する抗原としては、hIGF-I や hIGF-II の精製蛋白質や部

分配列を有するペプチドがあげられる。第一抗体としては、ハイブリドーマなどの培養上清あるいは精製抗体などの測定対象物があげられる。第二抗体としては、第一抗体を認識することができる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射性同位元素などで標識した抗体があげられる。具体的には、西洋ワサビペルオキシダーゼで標識された抗ラットイムノグロブリン（以下、rIgと表記する）マウス抗体などがあげられる。

競合 ELISA とは、あらかじめ hIGF-I あるいは hIGF-II を ELISA プレートに固定化し、測定対象物である抗体と、hIGF-I あるいは hIGF-II とを同時に添加して、反応させ、プレートに固定化した抗原と反応対象物である抗体の反応を、反応液中に添加したもう一種あるいは同一の抗原が阻害することを、プレートに結合する一次抗体の量の変化で測定する方法である。抗体の結合量の変化は抗体に対する二次抗体により検出する。また、天然型の hIGF および hIGF の部分ペプチドを用いた競合 ELISA により、天然型の hIGF との反応性および抗原エпитープを解析することができる。抗体が hIGF の立体構造を認識しているか否かは、通常行われる構造的解析法により調べることができる。構造的解析法としては、例えば、X線結晶解析、核磁気共鳴法などがあげられる。

## (2) バイオセンサーピアコアによる活性評価

バイオセンサーピアコアによる測定は、2 分子間の結合と解離に伴うセンサーチップ表面で生じる微量な質量変化を光学現象により、SPR シグナルとして検出するものである。本法での測定から導きだされた結合速度定数（以下、 $K_{ass}$  と表記する）、解離速度定数（以下、 $K_{diss}$  と表記する）から、 $K_A = K_{ass}/K_{diss}$  で計算される結合定数（以下、 $K_A$  と表記する）が算出される。 $K_A$  は、 $M^{-1}$  の単位で表される。バイオセンサーピアコアでの測定は、添付の使用説明書に従って至適な測定条件下で行うことができる。至適な測定条件としては、センサーチップへ固定化するリガンドの量は、式 1 により算出される最小値と式 2 で算出される最大値の間の範囲であることが好ましい。また、アナライトの結合量は、式 3 で算出される最大結合量以下であることが好ましい。式 1、式 2 および式 3

において、リガンドとはセンサーチップに固定化する分子を示し、アナライトとは流路系を介して添加する分子を示し、S とはリガンドの結合部位数を示す。RU とは、Resonance Unit の略であり、センサーチップ表面での単位面積あたりの質量の変化量を示し、1 RU = 1 pg/mm<sup>2</sup> に相当する。バイオセンサーピアコアでの測定では、最大結合量が維持できるように流速および洗浄条件を設定することにより、蛋白質の結合様式に則った結合定数の解析を行うことができる。

(式 1)

最小固定化量(RU) =  $200 \times 1/S \times (\text{リガンドの分子量} / \text{アナライトの分子量})$

(式 2)

最大固定化量(RU) =  $1000 \times 1/S \times (\text{リガンドの分子量} / \text{アナライトの分子量})$

(式 3)

最大結合量 =  $\text{アナライトの分子量} \times \text{リガンドの固定化量(RU)} / \text{リガンドの分子量} \times S$

#### 4. 本発明のヒト化抗体または該抗体断片の使用方法

本発明の抗 hIGF 抗体およびその抗体断片は、hIGF-I および hIGF-II と特異的にかつ同程度の強さで結合し、かつ、その機能を阻害するため、hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患などの治療に有用であると考えられる。また、ヒト化抗体は、ヒト以外の動物の抗体に比べ、ヒト抗体のアミノ酸配列に由来する部分がほとんどであるため、ヒト体内において免疫原性を示さず、反復投与が可能であり、かつ、その効果が長期間に渡り持続することが期待される。

hIGF 介在性疾患および異常な hIGF の産生亢進により病態が進行する疾患としては、癌、末端肥大症および糖尿病合併症などがあげられる。

本発明の抗 hIGF 抗体およびその抗体断片は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される 1 つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内などの非経口投与をあげることができ、蛋白質またはペプチド製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

本発明の抗 hIGF 抗体およびその抗体断片は、単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される 1 つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤などがあげられる。経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などがあげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトールなどの賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤などがあげられる。注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液あるいは両者の混合物からなる担体などを用いて調製される。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該抗体および抗体断片そのもの、ないしは受容者の口腔およ



び気道粘膜を刺激せず、かつ該抗体および抗体断片を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体などを用いて調製される。

担体として具体的には乳糖、グリセリンなどが例示される。該抗体および抗体断片、さらには用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダーなどの製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、体重などにより異なるが、通常成人1日当たり  $10\mu\text{g/kg}$  ~  $10\text{mg/kg}$  である。

以下に、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

### (実施例1)

抗ヒト IGF ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL をコードする cDNA の構築

#### (1) 抗ヒト IGF ヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列の設計

抗ヒト IGF ヒト型 CDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

参考例5の1.項で決定した抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 (ラット IgG2b) の VH (配列番号2) の CDR のアミノ酸配列を移植するための、ヒト抗体の VH の FR のアミノ酸配列を以下のようにして選択した。

公的データベースより、抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の FR と最も高い相同性を有するヒト抗体の FR を検索した結果、抗体 CAM (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 77, 3239-3243, 1980) が最も高い 81.6% の相同性を有していた。そこで、抗体 CAM (以下、Cam と記す) の VH の FR のアミノ酸配列を基に、抗hIGF ヒト型 CDR 移植抗体 (以下、抗hIGFCDR 移植抗体と記す) の VH のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

Cam の FR には、アミノ酸配列が一義的に決定されていない箇所が 4 箇所（13 番目、74 番目、77 番目、90 番目）存在し、また、ヒト抗体の VH の FR のアミノ酸配列では一般的でないアミノ酸残基が、3 番目と 40 番目に認められた。そこで、これらのアミノ酸残基については、免疫原性をより低下させるため、ヒト抗体で高い頻度で認められるアミノ酸残基（Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）へ改変した。このようにして設計した Cam 由来の FR のアミノ酸配列の適切な位置に、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 11 に記載の VH のアミノ酸配列 CamHV0 を設計した。

更に、Cam とは異なるヒト抗体 FR からなる抗 hIGFCDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。

Kabat らは、既知の様々なヒト抗体の VH をそのアミノ酸配列の相同性から 3 種類のサブグループ（HSG I～III）に分類し、さらに、それら各サブグループの共通配列を報告している（Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991）。この様な共通配列を有する抗体は、ヒトにおいて、免疫原性が低いことが期待されることから、この共通配列の FR を基に抗 hIGFCDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列を設計した。より活性の高い抗 hIGFCDR 移植抗体を作製するために、設計にあたってはヒト抗体の VH の 3 種類のサブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列のうち、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有するアミノ酸配列を検索した。相同性の検索結果を第 1 表に示した。第 1 表に示したように、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH 領域の FR のアミノ酸配列はサブグループ III の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有していた。

## 第1表

ヒト抗体の VH の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の FR のアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>
63.2%	56.3%	86.2%

以上の結果から、ヒト抗体の VH のサブグループ III の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 54 に記載の抗 hIGFCDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 HV0(3)を設計した。

次に、抗 hIGFCDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列を以下のようにして設計した。参考例 5 の 1. で決定した抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL (配列番号 4) の CDR のアミノ酸配列を移植するためのヒト抗体の VL の FR のアミノ酸配列を以下のようにして選択した。

Kabat らは、既知の様々なヒト抗体の VL をそのアミノ酸配列の相同性から 4 種類のサブグループ (HSG I~IV) に分類し、さらにそれら各サブグループの共通配列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を報告している。そこで、ヒト抗体の VL の 4 種類のサブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列のうち、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有する FR のアミノ酸配列を検索した。相同性の検索結果を第 2 表に示した。第 2 表に示したように、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL 領域の FR のアミノ酸配列はサブグループ IV の FR のアミノ酸配列と最も高い相同性を有していた。

## 第2表

ヒト抗体の VL の各サブグループの共通配列の FR のアミノ酸配列と抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の FR のアミノ酸配列との間の相同性

<u>HSGI</u>	<u>HSGII</u>	<u>HSGIII</u>	<u>HSGIV</u>
66.3%	61.3%	66.3%	67.5%

以上の結果から、ヒト抗体の VL のサブグループ IV の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 14 に記載の抗 hIGFCDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列 LV0 を設計した。

また、2 番目に相同性の高いヒト抗体の VL はサブグループ I であった。そこで、サブグループ I の共通配列の FR のアミノ酸配列の適切な位置に抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の CDR のアミノ酸配列を移植し、配列番号 55 に記載の抗 hIGFCDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列 LV0(1) を設計した。

上記で設計した抗 hIGFCDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 CamHV0 および HV0(3)、ならびに VL のアミノ酸配列 LV0 および LV0(1) は、選択したヒト抗体の FR のアミノ酸配列に抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の CDR のアミノ酸配列のみを移植した配列であるが、一般にヒト型 CDR 移植抗体では、CDR のアミノ酸配列の移植のみでは抗原との結合活性が低下してしまうことが多く、それを回避するため、ヒト抗体とヒト以外の動物の抗体で異なっている FR のアミノ酸残基のうち、抗原との結合活性に影響を与えられられるアミノ酸残基を CDR のアミノ酸配列とともに移植することが行われている。そこで、本実施例においても、抗原との結合活性に影響を与えられられる FR のアミノ酸残基を以下のようにして同定した。

まず、上記で設計した抗 hIGFCDR 移植抗体の VH のアミノ酸配列 CamHV0 と HV0(3)、および抗 hIGFCDR 移植抗体の VL のアミノ酸配列 LV0 と LV0(1) からなる

4通りの組み合わせのヒト型 CDR 移植抗体 [以下、CamHV0 のアミノ酸配列を有する VH と LV0 のアミノ酸配列を有する VL を組み合わせた抗 hIGFCDR 移植抗体を CamHV0/LV0 などと記す ; CamHV0/LV0、CamHV0/LV0 (1)、HV0(3)LV0 および HV0(3)LV0(1) 。] の V 領域の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製に関してはソフトウェア AbM (Oxford Molecular 社製) を、三次元構造の表示についてはソフトウェア Pro-Explore (Oxford Molecular 社製)、RasMol (Glaxo 社製) または Viewer Lite (Accelrys Inc. 社製) を用いて、それぞれ添付の使用説明書に従い、行った。同様に、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の V 領域の三次元構造のコンピューターモデルも構築した。更に、それぞれのヒト型 CDR 移植抗体 V 領域の FR のアミノ酸配列において、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の V 領域のアミノ酸配列中に認められるアミノ酸残基と異なっている残基について、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 のアミノ酸配列中のアミノ酸残基に改変したアミノ酸配列からなる改変体の三次元構造モデルを同様に構築し、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468、およびそれぞれの改変体の元となった 4通りの組み合わせのヒト型 CDR 移植抗体の V 領域の三次元構造を比較した。

その結果、改変体の V 領域の FR のアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の抗原との結合活性に影響を与えられ残基として、CamHV0 では 1 番目の Gln、97 番目の Ala、98 番目の Arg を選択した。さらに、三次元構造モデルからでは抗体の活性への影響は明らかではなかったが、42 番目のアミノ酸は一般に Gly であるのに対して、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 では Thr であり、本アミノ酸残基が抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 において特異的な役割を果たしている可能性が考えられたため、本残基も改変候補として選択した。同様に、HV0(3)では 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg を、LV0 では 4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、

46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val を、LV0(1)では 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe をそれぞれ選択した。

このようにして選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも 1 つを抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の V 領域のアミノ酸配列中のアミノ残基へ改変し、様々な改変を有するヒト型 CDR 移植抗体の VH および VL のアミノ酸配列を設計した。

## (2) CamHV0 をコードする cDNA の構築

実施例 1 (1) で設計したアミノ酸配列 CamHV0 をコードする cDNA を以下のようにして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列の N 末端に配列番号 2 の 1 番目から 19 番目のアミノ酸配列に相当する抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の H 鎖の分泌シグナル配列を連結した。該配列を配列番号 12 に示した。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮した。

変換した遺伝子コドンを連結して、該アミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、配列番号 13 に示した。該塩基配列の 5' 末端と 3' 末端に、ヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列を含む PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列をそれぞれ付加し、CamHV0 をコードする塩基配列とした。該塩基配列を 5' 末端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順にして、配

列番号 30、31、32 および 33 で表される 4 本の合成オリゴ DNA (ファスマック社製) を合成した。

各合成オリゴ DNA を最終濃度が  $0.1\mu\text{M}$  となるように KOD-plus polymerase (TOYOBO 社製) に添付の反応液に加え、更に  $0.4\mu\text{M}$  T3 プライマー (Takara Bio 社製)、 $0.4\mu\text{M}$  T7 プライマー (Takara Bio 社製) および 1 単位の KOD-plus polymerase (TOYOBO 社製) を用いて、合計  $50\mu\text{L}$  とし、PCR 反応を行った。反応条件は  $94^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $60^{\circ}\text{C}$  30 秒間、 $72^{\circ}\text{C}$  60 秒間のサイクルを 35 サイクルで行った。反応後、該反応液を 1.5 %アガロース電気泳動により分画し、約 0.5 kbp 付近の遺伝子断片を、ゲル抽出キット (QIAGEN 社製) を用いて回収した。回収した遺伝子断片を制限酵素 EcoRI (Takara Bio 社製) および XhoI (Takara Bio 社製) を用いて、消化反応を行った後に、該反応液を 1.5%アガロース電気泳動により分画し、制限酵素処理された遺伝子断片をゲル抽出キット (QIAGEN 社製) を用いて回収した。

pBluescript II SK(-) (以下、pBS と記す) (Stratagene 社製) を上記遺伝子断片と同様に制限酵素 EcoRI (Takara Bio 社製) および XhoI (Takara Bio 社製) を用いて、消化反応を行った後、分画、回収し、Ligation high (TOYOBO 社製) を用いて添付説明書に従い pBS と CamHV0 遺伝子断片の連結反応を行った。連結反応により得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、形質転換株よりミニプレップ (QIAGEN 社製) を用いて、添付説明書に従いプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を解析し、目的のアミノ酸配列 CamHV0 をコードする塩基配列を含む、第 1 図に示したプラスミド pBS/CamHV0 を取得した。

### (3) 抗 hIGFCDR 移植抗体の VH の改変体をコードする cDNA の構築

実施例 1 (1) で設計した抗 hIGFCDR 移植抗体の VH の改変体をコードする cDNA の構築は以下のように行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子コドンについては、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 で見られる遺伝子コドンとなる

ように行った。また、PCR 反応は KOD-plus polymerase (TOYOBO 社製) を使用し、添付説明書に従って行った。

以下で使用した合成オリゴ DNA はファスマック社製のものを使用した。

(3-1) 1 番目の Gln を Glu へ、97 番目の Ala を Thr へ、98 番目の Arg を Thr へそれぞれ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、QAR と記す) をコードする cDNA の構築

実施例 1 (2) で得られた pBS/CamHV0 を鋳型として、配列番号 38 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 41 で表される合成オリゴ DNA を用いて、94°C 30 秒間、58°C 45 秒間、72°C 60 秒間のサイクルを 35 サイクルの条件で PCR 反応を行った。反応後、実施例 1 (2) と同様にして該反応液を 1.5 %アガロース電気泳動により目的の遺伝子断片を分画、回収した後、回収した遺伝子断片を pBS にクローニングして、目的のアミノ酸配列 QAR をコードする、配列番号 17 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/QAR を取得した。

(3-2) 1 番目の Gln を Glu へ、42 番目の Gly を Thr へ、97 番目の Ala を Thr へ、98 番目の Arg を Thr へ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、QGAR と記す) をコードする cDNA の構築

実施例 1 (2) で得られた pBS/CamHV0 を鋳型として、配列番号 38 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 39 で表される合成オリゴ DNA を用いて約 250bp の 5' -QG 遺伝子断片を、また、配列番号 40 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 41 で表される合成オリゴ DNA を用いて約 250bp の 3' -GAR 遺伝子断片を、それぞれ上記 (3-1) と同様にして PCR 反応で増幅後、1.5 %アガロース電気泳動により目的の遺伝子断片を分画、回収した。回収したそれぞれの遺伝子断片、5' -QG 遺伝子断片の 5' 末端に位置する T3 プライマー (Takara Bio 社製) および 3' -GAR 遺伝子断片の 3' 末端に位置する T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて上記 (3-2) と同様にして PCR 反応を行った。反応後、実施例 1 (2) と同様にして該反応液を 1.5 %アガロース電気泳動により約 500bp の遺伝子断片を分画、回収した後、回収した遺伝子断片を pBS にクローニングして、目的の



配列番号 26 で示されるアミノ酸配列 QGAR をコードする、配列番号 18 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/QGAR を取得した。

#### (4) LV0 をコードする cDNA の構築

実施例 1 (1) で設計したアミノ酸配列 LV0 をコードする cDNA を以下のようにして構築した。

まず、設計したアミノ酸配列の N 末端に配列番号 4 の 1 番目から 22 番目のアミノ酸配列に相当する抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の L 鎖の分泌シグナル配列を連結した。該配列を配列番号 15 に示した。次に、該アミノ酸配列を遺伝子コドンに変換した。1 つのアミノ酸残基に対して複数の遺伝子コドンが存在する場合は、抗体の遺伝子の塩基配列に見られる使用頻度 (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) を考慮した。

変換した遺伝子コドンを連結して、該アミノ酸配列をコードする cDNA の塩基配列を設計し、配列番号 16 に示した。該塩基配列の 5' 末端と 3' 末端にヒト化抗体発現用ベクターへクローニングするための制限酵素認識配列を含む PCR 反応時の増幅用プライマーの結合塩基配列をそれぞれ付加した。設計した塩基配列を 5' 末端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順にして、配列番号 34、35、36 および 37 で表される 4 本の合成オリゴ DNA を合成した。

各合成オリゴ DNA を用いて、実施例 1 の (2) と同様にして PCR 反応から pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的のアミノ酸配列 LV0 をコードする、配列番号 16 で示される cDNA を含む、第 1 図に示したプラスミド pBS/LV0 を取得した。

#### (5) 抗 hIGFCDR 移植抗体の VL の改変体をコードする cDNA の構築

実施例 1 (1) で設計した抗 hIGFCDR 移植抗体の VL の改変体のアミノ酸配列をコードする cDNA の構築は以下のように行った。改変後のアミノ酸残基の遺伝子

コドンについては、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 で見られる遺伝子コドンとなるように行った。また、PCR 反応は KOD-plus polymerase (TOYOBO 社製) を使用し、添付説明書に従って行った。

(5-1) 4 番目の Met を Leu へ、9 番目の Asp を Thr へ、10 番目の Ser を Thr へ、11 番目の Leu を Met へ、15 番目の Leu を Pro へ、22 番目の Asn を Thr へ、35 番目の Tyr を Phe へ、42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、69 番目の Asp を Ser へ、70 番目の Phe を Tyr へ、71 番目の Thr を Ser へ、82 番目の Val を Ala へ、84 番目の Val を Thr へそれぞれ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、A11 と記す) をコードする cDNA の構築

アミノ酸配列 A11 をコードする、配列番号 19 で示される cDNA の塩基配列を 5' 末端側から約 150 塩基ずつ計 4 本の塩基配列に分割し (隣り合う塩基配列は、その末端に約 20 塩基の重複配列を有するようにする)、それらをセンス鎖、アンチセンス鎖の交互の順にして、配列番号 46、47、48 および 49 で表される合成オリゴ DNA を合成した。

各オリゴ DNA を用い実施例 1 (2) と同様にして、PCR 反応から pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的のアミノ酸配列 A11 をコードする、配列番号 19 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/A11 を取得した。

(5-2) 42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、82 番目の Val を Ala へ、84 番目の Val を Thr へそれぞれ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、PLLVV と記す) をコードする cDNA の構築

実施例 1 (4) で得られた pBS/LV0 を鋳型として、配列番号 42 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 50 で表される合成オリゴ DNA を用いて、5' -PLL 遺伝子断片を、また、配列番号 44 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 49 で表される合成オリゴ DNA を用いて 3' -VV 遺伝子断片をそれぞれ上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行った。反応後、実施例 1 (2) と同様にして該反応液を 1.5% アガロースゲル電気泳動により目的の遺伝子断片を分画、回収した。回収したそれぞれの遺伝子断片、5' -PLL 遺伝子断片の 5' 末端に位置する T3 プライマ

ー (Takara Bio 社製) および 3' -VV 遺伝子断片の 3' 末端に位置する T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて上記 (3-1) と同様にして PCR 反応から pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的のアミノ酸配列 PLLVV をコードする、配列番号 20 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/PLLVV を取得した。

(5-3) 22 番目の Asn を Thr へ、42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、82 番目の Val を Ala へ、84 番目の Val を Thr へそれぞれ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、NPLLVV と記す) をコードする cDNA の構築

実施例 1 (4) で得られた pBS/LV0 を鋳型として、配列番号 42 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 43 で表される合成オリゴ DNA を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、NPLL 遺伝子断片を増幅し、実施例 1 (2) と同様にして該反応液を 1.5% アガロースゲル電気泳動により目的の遺伝子断片を分画、回収した。回収した NPLL 遺伝子断片および配列番号 50 で表される合成オリゴ DNA を用いて上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、5' -NPLL 遺伝子断片を増幅し、実施例 1 (2) と同様にして該反応液を 1.5% アガロースゲル電気泳動により目的の遺伝子断片を分画、回収した。回収した 5' -NPLL 遺伝子断片、上記 (5-2) で得られた 3' -VV 遺伝子断片、T3 プライマー (Takara Bio 社製) および T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-2) と同様にして PCR 反応から、pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的のアミノ酸配列 NPLLVV をコードする、配列番号 21 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/NPLLVV を取得した。

(5-4) 22 番目の Asn を Thr へ、35 番目の Tyr を Phe へ、42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へそれぞれ改変した改変体のアミノ酸配列 (以下、NYPLL と記す) をコードする cDNA の構築

上記 (5-4) で得られた pBS/NPLLVV を鋳型として、配列番号 50 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 53 で表される合成オリゴ DNA を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、5' -NYPLL-1 遺伝子断片を回収した。一方、実施

例 1 (4) で得られた pBS/LV0 を鋳型として、配列番号 44 で表される合成オリゴ DNA と T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、3' -LV0 遺伝子断片を回収した。5' -NYPLL-1 遺伝子断片、3' -LV0 遺伝子断片、T3 プライマー (Takara Bio 社製) および T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-2) と同様にして PCR 反応から、pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的のアミノ酸配列 NYPLL をコードする、配列番号 22 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/NYPLL を取得した。

(5-5) 22 番目の Asn を Thr へ、35 番目の Tyr を Phe へ、42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、69 番目の Asp を Ser へ、70 番目の Phe を Tyr へ、71 番目の Thr を Ser へ、82 番目の Val を Ala へ、84 番目の Val を Thr へそれぞれへ改変した改変体のアミノ酸配列(以下、NYPLL3A11 と記す) をコードする cDNA の構築

上記 (5-4) で得られた pBS/NYPLL を鋳型として、配列番号 45 で表される合成オリゴ DNA と配列番号 50 で表される合成オリゴ DNA を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、5' -NYPLL-2 遺伝子断片を回収した。一方、上記 (5-1) で得られた pBS/A11 を鋳型として、配列番号 44 で表される合成オリゴ DNA および T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、3' -3A11 遺伝子断片を回収した。5' -NYPLL-2 遺伝子断片、3' -3A11 遺伝子断片、T3 プライマー (Takara Bio 社製) および T7 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-2) と同様にして PCR 反応から、pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的の配列番号 27 に示されるアミノ酸配列 NYPLL3A11 をコードする、配列番号 23 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/NYPLL3A11 を取得した。

(5-6) 42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、69 番目の Asp を Ser へ、70 番目の Phe を Tyr へ、71 番目の Thr を Ser へそれぞれ変換した改変体のアミノ酸配列 (以下、PLDFT と記す) をコードする cDNA の構築

実施例 1 (4) で得られた pBS/LV0 を鋳型として、配列番号 51 で表される合成オリゴ DNA と M13RV プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、5' -PL 遺伝子断片を回収した。一方、pBS/LV0 を鋳型として、配列番号 52 で表される合成オリゴ DNA と M13M20 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、3' -DFT 遺伝子断片を回収した。5' -PL 遺伝子断片、3' -DFT 遺伝子断片、M13RV プライマー (Takara Bio 社製) および M13M20 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-2) と同様にして PCR 反応から、pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的の配列番号 28 に示されるアミノ酸配列 PLDFT をコードする、配列番号 24 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/PLDFT を取得した。

(5-7) 42 番目の Pro を Ser へ、45 番目の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、69 番目の Asp を Ser へ、70 番目の Phe を Tyr へ、71 番目の Thr を Ser へそれぞれ変換した改変体のアミノ酸配列 (以下、PLLDFV と記す) をコードする cDNA の構築

上記で得られた pBS/PLLVV を鋳型として、配列番号 45 で表される合成オリゴ DNA と M13RV プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-1) と同様にして PCR 反応を行い、5' -PLL 遺伝子断片を回収した。5' -PLL 遺伝子断片、上記 (5-6) で得られた 3' -DFT 遺伝子断片、M13RV プライマー (Takara Bio 社製) および M13M20 プライマー (Takara Bio 社製) を用いて、上記 (3-2) と同様にして PCR 反応から、pBS へのクローニングまでの操作を行い、目的の配列番号 29 に示されるアミノ酸配列 PLLDFV をコードする、配列番号 25 で示される cDNA を含むプラスミド pBS/PLLDFV を取得した。

## (実施例 2)

### 抗 hIGFCDR 移植抗体の発現

#### (1) 抗 hIGFCDR 移植抗体発現ベクターの構築

WO97/10354 に記載のヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の適当な位置に実施例 1(2)および(4)で取得したアミノ酸配列 CamHV0 またはアミノ酸配列 LV0 をコードする cDNA およびこれらの改変体のアミノ酸配列をコードする cDNA を挿入し、各種抗 hIGFCDR 移植抗体発現ベクターを以下のようにして構築した。

アミノ酸配列 CamHV0、QAR および QGAR をコードする cDNA と pKANTEX93 をそれぞれ制限酵素 NotI および ApaI で処理し、1.5%アガロースゲル電気泳動により、それぞれ約 0.5kbp、12kbp の遺伝子断片を分離、回収した。Ligation high (TOYOBO 社製) を用いて pKANTEX93 とアミノ酸配列 CamHV0、QAR および QGAR をコードする遺伝子断片を連結し、プラスミド pKANTEX93/CamHV0、pKANTEX93/QAR および pKANTEX93/QGAR を取得した。

次に VLcDNA を挿入するため、アミノ酸配列 LV0、NYPLL3A11、PLDFT および PLLDFT をコードする cDNA と上記で得られた pKANTEX93/CamHV0、pKANTEX93/QAR および pKANTEX93/QGAR をそれぞれ制限酵素 EcoRI および BsiWI で処理した後、1.5%アガロースゲル電気泳動により、それぞれ約 0.45kbp、12.5kbp の遺伝子断片を分離し、ゲル抽出キット (QIAGEN 社製) を用いて回収した。Ligation high (TOYOBO 社製) を用いて pKANTEX93/CamHV0、pKANTEX93/QAR または pKANTEX93/QGAR と各種 VL 遺伝子断片とを連結反応させ、連結反応により得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株を形質転換し、形質転換株よりミニプレップ (QIAGEN 社製) を用いて、添付説明書に従いプラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit ver.3 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を解析し、第 2 図に示したプラスミド pKANTEX93/CamHV0/LV0、pKANTEX93/QAR/LV0、pKANTEX93/QGAR/LV0、pKANTEX93/CamHV0/NYPLL3A11、pKANTEX93/QGAR/PLDFT および pKANTEX93/QGAR/PLLDFT を取得した。

## (2) 抗 hIGFCDR 移植抗体の動物細胞を用いた安定発現

抗 hIGFCDR 移植抗体の動物細胞を用いた安定発現は、以下のように行った。

実施例 2 の (1) で得られた各抗 hIGFCDR 移植抗体発現ベクターの  $10\mu\text{g}$  を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) ヘエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、40 mL の H-SFM (5) 培地 [ FCS を 5% 含む H-SFM (Gibco BRL 社製) ] に懸濁し、96 ウェル培養プレート (住友ベークライト社製) に  $200\mu\text{L}$ /ウェルずつ分注した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換体のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、実施例 2 (5) に記載のヒト IgG 定量 ELISA を行い抗 hIGFCDR 移植抗体発現細胞の選択を行った。

培養上清中に抗 hIGFCDR 移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換体については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、dhfr 遺伝子産物のジヒドロ葉酸還元酵素 (以下、DHFR と表記する) の阻害剤であるメソトレキセート (以下、MTX と表記する ; SIGMA 社製) を 50nM 含む H-SFM(5) に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェル培養プレート (Greiner 社製) に 1mL ずつ分注した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換株を誘導した。形質転換体がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗 hIGFCDR 移植抗体の濃度を、実施例 2 (5) に記載のヒト IgG 定量 ELISA に準じて行い抗体発現量を確認した。

培養上清中に抗 hIGFCDR 移植抗体の発現が認められたウェルの形質転換体については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM(5) で増殖可能かつ、抗 hIGFCDR 移植抗体を高発現する形質転換体を得た。該形質転換体の培養上清中に含まれるヒト IgG の定量を実施例 2 (5) に記載のヒト IgG 定量 ELISA により行い、抗 hIGFCDR 移植抗体の発現量の最も多い MTX 耐性形質転換体を取得した。MTX 耐性形質転換体は必要に応じて、1~2 回の限界希釈法による単一細胞

化を行い、抗 hIGFCDR 移植抗体の発現量の最も多い形質転換クローンを取得した。

以下において、各抗 hIGFCDR 移植抗体をそれぞれの V 領域のアミノ酸配列を組み合わせて、プラスミド pKANTEX93/CamHV0/LV0 が導入された形質転換体から生産される抗 hIGFCDR 移植抗体を CamHV0/LV0 と、プラスミド pKANTEX93/QAR/LV0 が導入された形質転換体から生産される抗 hIGFCDR 移植抗体を QAR/LV0 と、プラスミド pKANTEX93/QGAR/LV0 が導入された形質転換体から生産される抗 hIGFCDR 移植抗体を QGAR/LV0 と、プラスミド pKANTEX93/CamHV0/NYPLL3A11 が導入された形質転換体で生産される抗 hIGFCDR 移植抗体から CamHV0/NYPLL3A11 と、プラスミド pKANTEX93/QGAR/PLDFT が導入された形質転換体から生産される抗 hIGFCDR 移植抗体を QGAR/PLDFT とおよびプラスミド pKANTEX93/QGAR/PLLDFT が導入された形質転換体から生産される抗 hIGFCDR 移植抗体を QGAR/PLLDFT とそれぞれ称す。

### (3) 抗 hIGFCDR 移植抗体の培養上清からの精製

実施例 2 (2) で得られた各抗 hIGFCDR 移植抗体を発現する形質転換体を、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM、を含む GIT 培地（大日本製薬社製）500 mL に、 $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、2L ローラーボトル（ファルコン社製）に分注した。37°C インキュベーター内で 7~8 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約 1L より Prosep-A（Bioprocessing 社製）カラムを用いて、添付の説明書に従い、各種抗 hIGFCDR 移植抗体を精製した。

### (4) 抗 hIGFCDR 移植抗体の抗原への結合活性の評価（結合 ELISA）

ELISA プレートに固定化する抗原としては、hIGF-I（藤沢薬品社製）とメチル化 BSA（SIGMA 社製）とのコンジュゲートを作製して、使用した。すなわち、蒸留水に溶解したメチル化 BSA を、メチル化 BSA:hIGF-I=1:8（重量比）になるように 4°C で混合し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌して、メチル化 BSA と hIGF-I のコンジュゲートを取得した（以下、mBSA-hIGF-I と記す）。



96 ウェル ELISA プレート (Greiner 社製) に、上述の mBSA-hIGF-I を hIGF-I の濃度として 20 ng/mL で 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBS で洗浄後、1%BSA を含む PBS (以下、BSA-PBS と記す) を 100  $\mu$ L/ウェルで加え、室温で 1 時間反応させて残存する活性基をブロックした。BSA-PBS を捨て、各種形質転換体の培養上清あるいは精製した各種抗 hIGFCDR 移植抗体を 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、室温で 2 時間反応させた。反応後、各ウェルを 0.05%Tween 20 を含む PBS (以下、Tween-PBS と記す) で洗浄後、2000 倍に希釈した HRP 標識化抗ヒト IgG 抗体 (American Qualex 社製) を二次抗体として 50  $\mu$ L/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を 1  $\mu$ L/mL で添加した溶液] を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と記す) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

#### (5) ヒト IgG 定量 ELISA (サンドイッチ ELISA)

96 ウェル ELISA プレート (Greiner 社製) に、抗ヒト IgG 抗体 (American Qualex 社製) を PBS で 2000 倍に希釈し、50  $\mu$ L/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させプレートを作製した。BSA-PBS を用いて残存する活性基をブロックする操作以降の操作は、上記の実施例 2 (4) に記載の結合 ELISA と同様に行った。

#### (実施例 3)

##### 抗 hIGFCDR 移植抗体の反応性の確認

実施例 2 (3) で得られた各種抗 hIGFCDR 移植抗体の精製標品については、実施例 2 (4) に記載の結合 ELISA、または下記に示す実施例 3 (2) に記載のバイオセンサーピアコア (ピアコア社製) を用いた hIGF との結合親和性の測定法などを用いて、hIGF への結合活性を検討した。以下の検討において、抗 hIGF ヒト

型キメラ抗体 KM3002 は、参考例 6 (4) に記載の方法に従って精製したものを  
用いた。

(1) mBSA-hIGF-I に対する結合 ELISA

実施例 2 (3) に記載した方法により精製した各種抗 hIGFCDR 移植抗体の  
mBSA-hIGF-I への結合活性を検討した。結果を第 3 図に示した。第 3 図 a に示し  
たように、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の CDR のみをヒト抗体 Cam  
の FR および VL のサブグループ IV の共通配列の FR に移植した抗 hIGFCDR 移植  
抗体 CamHV0/LV0 では、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 に比べ、hIGF-I に対す  
る結合活性が約 1/50 に低下していた。そこで、各 FR のアミノ酸を改変するこ  
とにより hIGF-I 結合活性の増加を検討した。

抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 から VH の 1 番目の Gln を Glu へ、97 番目の  
Ala を Thr へ、98 番目の Arg を Thr へそれぞれ改変した抗 hIGFCDR 移植抗体  
QAR/LV0 では、第 3 図 a に示したように、CamHV0/LV0 に比べて hIGF-I に対する  
結合活性の増加は認められなかった。しかし、1 番目の Gln を Glu へ、97 番目  
の Ala を Thr へ、98 番目の Arg を Thr へのアミノ酸改変に加えて、42 番目の  
Gly を Thr へ改変した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0 では、第 3 図 a に示したよ  
うに、CamHV0/LV0 と比較して約 25 倍の結合活性の上昇が認められ、その活性は、  
抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の結合活性の約 1/2 であった。

以上の結果から、CamHV0 の 1 番目の Gln を Glu へ、97 番目の Ala を Thr へ、  
98 番目の Arg を Thr へのアミノ酸改変に加えて、42 番目の Gly を Thr へ改変す  
ることで hIGF-I に対する結合活性を上昇させることが可能であること、また、  
三次元構造モデルでは活性への寄与が不明であった 42 番目の Gly は、本抗体の  
活性に非常に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

一方、VL の改変体については、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 から VL の 22  
番目の Asn を Thr へ、35 番目の Tyr を Phe へ、42 番目の Pro を Ser へ、45 番目  
の Leu を Pro へ、46 番目の Leu を Trp へ、69 番目の Asp を Ser へ、70 番目の  
Phe を Tyr へ、71 番目の Thr を Ser へ、82 番目の Val を Ala へ、84 番目の Val

を Thr へそれぞれ改変した抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/NYPLL3A11 の hIGF-I に対する結合活性は、第 3 図 a に示したように、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 と比較して約 25 倍の結合活性の上昇が認められ、その活性は、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の結合活性の約 1/2 の結合活性であった。以上の結果から、上記の VL の改変によって hIGF-I に対する結合活性を上昇させることが可能であることが明らかとなった。そこで、アミノ酸配列が QGAR である VH とアミノ酸配列が NYPLL3A11 である VL とを組み合わせた抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 の hIGF-I に対する結合活性を検討した。結果を第 3 図 b に示した。その結果、このような VH と VL を組み合わせた抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 は、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 と同等の結合活性を示すことが確認された。

次に、VL の改変体 NYPLL3A11 の 10 残基の改変したアミノ酸残基の中から、活性上昇に重要なアミノ酸残基を特定するため、改変アミノ酸残基数が少ないアミノ酸配列が PLDFT である VL の改変体および PLLDFT である VL の改変体と、アミノ酸配列が QGAR である VH の改変体とをそれぞれ組み合わせた抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT および抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT の hIGF-I に対する結合活性を検討した。

結果を第 3 図 b に示した。その結果、これら 2 種類の抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT および抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT は、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 と同等の hIGF-I への結合活性を示すことが明らかとなった。

## (2) バイオセンサーピアコアを用いた結合親和性の測定

抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 と上記の実施例 2 (3) で精製した各種抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF-I または hIGF-II への結合活性をバイオセンサー Biacore2000 (ピアコア社製) を用いて以下のようにして、結合親和性として測定した。サンプルの希釈と測定中の反応緩衝液には、HBS-EP (10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20 pH7.4) (ピアコア社製) を用いた。

センサーチップ CM-5 (ピアコア社製) に、アミンカップリングキット (ピアコア社製) を用いて、 $18.5 \text{ pg/mm}^2$  でリコンビナント hIGF-I (藤沢薬品社製) を、 $26.7 \text{ pg/mm}^2$  で hIGF-II (R&D 社製) を固定化し、アナライトとして  $10 \mu\text{g/mL}$  より 2 倍希釈で 5 段階に希釈した各種抗体を、流速  $5 \mu\text{L/分}$  で 4 分間添加し、結合反応を観察した後、5 分間にわたって解離反応を観察した。解離反応後、 $30 \text{ mM}$  塩酸の  $5 \mu\text{L}$  を 1 回添加してセンサーチップ表面を再生した。反応は  $25^\circ\text{C}$  で行った。各濃度における反応曲線から、結合速度定数  $K_{\text{ass}}$  および解離速度定数  $K_{\text{diss}}$  を算出し、これから各抗体の結合定数  $K_A \text{ (M}^{-1}\text{)}$  を算出した。結果を第 3 表に示した。

第 3 表

抗体	$K_A \text{ ( hIGF-I )}$	$K_A \text{ ( hIGF-II )}$
抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002	$2.94 \times 10^9$	$2.24 \times 10^9$
CamHV0/LV0	$0.17 \times 10^9$	$0.39 \times 10^9$
QAR/LV0	$0.17 \times 10^9$	$0.45 \times 10^9$
QGAR/LV0	$0.78 \times 10^9$	$1.75 \times 10^9$
CamHV0/NYPLL3A11	$1.32 \times 10^9$	$2.1 \times 10^9$
QGAR/NYPLL3A11	$2.32 \times 10^9$	$3.96 \times 10^9$
QGAR/PLDFT	$2.31 \times 10^9$	$4.02 \times 10^9$
QGAR/PLLDFT	$2.78 \times 10^9$	$3.52 \times 10^9$

抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 は、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 に比べ、hIGF-I または hIGF-II に対する  $K_A$  が、それぞれ約  $1/17$ 、約  $1/6$  に低下していた。

抗 hIGFCDR 移植抗体 QAR/LV0 では、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 に比べて結合親和性の増加は殆ど認められないが、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0 では、hIGF-I および hIGF-II に対する  $K_A$  が、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 に比べて、約 5 倍増加した。

一方、VL の抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/NYPLL3A11 では、hIGF-I または hIGF-II に対する  $K_A$  が、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 に比べて、それぞれ約 8 倍、約 5 倍増加していた。更に、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 では、hIGF-I または hIGF-II に対する  $K_A$  が、抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0 に比べて、それぞれ約 14 倍、約 10 倍増加していた。

改変アミノ酸残基が最適化されたアミノ酸配列 PLDFT またはアミノ酸配列 PLLDFT を有する VL とアミノ酸配列 QGAR を有する VH を組み合わせた抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT または抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT の hIGF-I または hIGF-II に対する結合親和性は、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 および抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 とほぼ同等であり、改変アミノ酸残基の減少による活性低下は認められなかった。

#### (実施例 4)

抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF 依存性増殖阻害効果

上記実施例 2 (3) で得られた抗 hIGFCDR 移植抗体精製標品の hIGF 依存性増殖に対する阻害活性を以下のようにして確認した。

ヒト大腸癌細胞株 HT-29 (ATCC HTB-38) を TF/BSA 培地[D-MEM/F-12 (Gibco BRL 社製) に 10  $\mu$ g/mL のヒトトランスフェリン (Gibco BRL 社製)、200  $\mu$ g/mL の BSA を添加した培地]で  $5 \times 10^4$  細胞/mL に調製し、96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$ L/ウェルで分注した。さらに、TF/BSA 培地で 40~80 ng/mL の濃度に希釈した hIGF-I あるいは hIGF-II を 50  $\mu$ L/ウェルで、TF/BSA 培地で各濃度に希釈した各抗 hIGFCDR 移植抗体を 50  $\mu$ L/ウェルで添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、細胞増殖試薬 WST-1 (Roche 社製) を 20  $\mu$ L/ウェル

で分注し、さらに、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2～3 時間培養した後に、OD450nm の吸光度 (以下、OD450 と表記する) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

結果を第 4 図から第 6 図にそれぞれ示した。各抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF 依存性増殖に対する阻害活性は、上記実施例 3 の結合 ELISA による hIGF-I との結合活性およびバイオセンサーピアコアを用いて測定した hIGF との結合親和性の測定結果と良く相関していた。即ち、高い hIGF との結合親和性を有する抗 hIGFCDR 移植抗体は、高い hIGF 依存性増殖に対する阻害活性を有しており、作製した抗 hIGFCDR 移植抗体のうち、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT は、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 と同等の hIGF 依存性増殖に対する阻害活性を有していることが示された。

以上の結果は、本実施例で作製した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11、抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT および抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT が、hIGF-I、hIGF-II に対する高い結合親和性および hIGF-I、hIGF-II の生物活性に対する高い中和活性を有していることを示している。また、これらの抗 hIGFCDR 移植抗体は、そのほとんどのアミノ酸残基がヒト抗体の配列に由来することから、hIGF の機能がその病態形成に関わる様々なヒト疾患の治療薬として有用である。

## 参考例

### (参考例 1)

#### 抗 hIGF モノクローナル抗体の作製

##### (1) 非ヒト動物の免疫

組換え型 hIGF-I (R&D 社製) は、免疫原性を高める目的で以下の方法でメチル化 BSA (SIGMA 社製) とのコンジュゲートを作製し、免疫原とした。すなわち、2 回蒸留水に溶解したメチル化 BSA を、メチル化 BSA:hIGF-I=1:4 (重量比) になるように 4°C で混合し、10 秒間ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、

連結針付きシリンジを用いて完全フロインドアジュバントあるいは不完全フロインドアジュバントと容量比 1:1 で混合し、免疫原（以下、メチル化 BSA-hIGF-I アジュバントと記す）とした。

5 週令雌 SD ラットに、完全フロインドアジュバントを用いて上記のように調製したメチル化 BSA-hIGF-I アジュバント (100  $\mu$ g の hIGF-I 相当量) を投与し、2 週間後より不完全フロインドアジュバントを用いて同様に調製した免疫原を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。

眼底静脈叢より採血し、その血清中の抗体価を参考例 1(4)項に示す結合 ELISA で調べ、十分な抗体価を示したラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。

脾臓を MEM 培地（日水製薬社製）中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1200 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し、赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に使用した。

## (2) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3-U1 を通常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  個以上の細胞を確保して、細胞融合に使用した。

## (3) ハイブリドーマの作製

参考例 1 (1) 項で得られたラット脾細胞と (2) 項で得られた骨髓腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞に 37°C で攪拌しながら、 $1.0 \times 10^2$  個のラット脾細胞あたり 0.2~1.0mL の融合培地 (2g の PEG-1000、2mL の MEM、0.7mL のジメチルスルホキシドの混液) を加え、1~2 分間毎に 1~2mL の MEM 培地を数回加えた後、さらに、MEM 培地を加えて全量が 50mL になるようにした。遠心分離 (900 rpm、5 分間) した後、上清を捨て、緩やかに細胞をほぐした後、100mL の HAT 培地 {通常培地 [RPMI-1640 培地に 1.5mM グルタミン、50  $\mu$ M 2-メルカプトエタノール、10  $\mu$ g/mL ジェンタマイシンおよび 10% 牛胎児血清 (以下、FCS と記す) を加えた培地]}

に0.1mM ヒポキサンチン、15 $\mu$ M チミジンおよび0.4 $\mu$ M アミノプテリンを加えた培地}に懸濁した。

この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 $\mu$ L/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37°Cで10~14日間培養した。この培養上清を参考例1(4)項に示す結合ELISAを用いて、メチル化BSA-hIGF-Iに反応して、陰性対照であるメチル化BSA-BSA[BSAを用いて上記参考例1(1)と同様の反応を行い作製したコンジュゲート]に反応しないウェルを選び、さらにHT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)と通常培地に換え、2回の単一細胞化を行い、抗hIGF-Iラットモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを確立した。

その結果、第7図に示した反応性を有する抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468、抗hIGFラットモノクローナルKM1469、抗hIGFラットモノクローナルKM1470、抗hIGFラットモノクローナルKM1471、抗hIGFラットモノクローナルKM1472および抗hIGFラットモノクローナルKM1473をそれぞれ産生する6クローンのハイブリドーマを取得した。各ハイブリドーマが産生する抗体のサブクラスを、サブクラスタイピングキットを用いたELISAにより検討した結果、いずれもIgG2bであった。

#### (4) モノクローナル抗体の選択 (結合ELISA)

ELISAプレートに固定化する抗原としては、参考例1(1)で作製したメチル化BSA-hIGF-Iおよび陰性対照としてメチル化BSA-BSAを用いた。96ウェルELISAプレート(Greiner社製)に、上述の抗原をhIGF-IあるいはBSAの濃度として10 $\mu$ g/mLで50 $\mu$ L/ウェルで分注し、4°Cで一晩放置して吸着させた。PBSで洗浄後、1%BSAを含むPBS(以下、BSA-PBSと記す)を100 $\mu$ L/ウェルで加え、室温で1時間反応させて残存する活性基をブロックした。BSA-PBSを捨て、被免疫ラット抗血清、抗hIGF-Iモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養上清あるいは精製した抗hIGF-Iラットモノクローナル抗体を50 $\mu$ L/ウェルで分注し、室温で2時間反応させた。反応後、各ウェルを0.05%Tween 20を含むPBS(以下、Tween-PBSと記す)で洗浄後、4000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ



抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を二次抗体として 50  $\mu$ L/ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム 0.55g を 1L の 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を 1  $\mu$ L/mL で添加した溶液] を 50  $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、415nm の吸光度 (以下、OD415 と記す) をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

(5) モノクローナル抗体の精製 プリスタン処理した 8 週令 Balb/c ノード雌マウスに参考例 1 (3) で得られたハイブリドーマを 5~20 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/匹でそれぞれ腹腔内注射した。10~21 日後に、ハイブリドーマが腹水癌化したマウスから、腹水を採取 (1~8mL/匹) し、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) して固形分を除去した。その後、カプリル酸沈殿法 (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) により IgG 画分を精製し、精製モノクローナル抗体とした。

#### (参考例 2)

抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の反応性の検討

##### (1) hIGF-I の天然の立体構造に対する反応性

参考例 1 (3) で選択された 6 種類の抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の液相系における天然の立体構造を保つ hIGF-I に対する反応性を、以下に示す競合 ELISA で調べた。

参考例 1 (4) に示した、参考例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I を固定化したプレートを準備し、20  $\mu$ g/mL より 5 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I を 50  $\mu$ L/ウェルで分注後、抗 hIGF-I ラットモノクローナル抗体の精製抗体を希釈した溶液 (抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468:6.0  $\mu$ g/mL、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1470:1.0  $\mu$ g/mL、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1471:0.16  $\mu$ g/mL、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1472:7.0  $\mu$ g/mL、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1473:1.2  $\mu$ g/mL) を 50  $\mu$ L/ウェルで分注し、混合して

室温で2時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、4000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットIg抗体(DAKO社製)を50 $\mu$ L/ウェルで加えて室温で1時間反応させた。反応後、Tween-PBSで洗浄後、ABTS基質液[2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウム]の0.55gを1Lの0.1Mクエン酸緩衝液(pH4.2)に溶解し、使用直前に過酸化水素水を1 $\mu$ L/mLで添加した溶液]を50 $\mu$ L/ウェルで加えて発色させ、OD415をプレートリーダーEmax(Molecular Devices社製)を用いて測定した。

第8図に示したように、抗hIGF-Iラットモノクローナル抗体はいずれもhIGF-Iの液層中の天然の立体構造と反応性を示した。また、本系において、最も高い感度を示した抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468では、液相系に含まれる16ng/mLまでの濃度の天然の立体構造を有するhIGF-Iを検出可能であった。

#### (2) 抗hIGFラットモノクローナルKM1468のhIGF-Iの競合的ELISAでの反応性

抗hIGFラットモノクローナルKM1468は、上記(1)においてhIGF-Iの立体構造を認識している可能性が示唆された。しかしながら、抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468は、アミノ酸一次配列を認識している可能性も考えられるため、hIGF-I部分ペプチドとの反応性を解析した。

##### (2-1) hIGF-Iの部分ペプチドの合成

WO01/64754に記載の方法に従って、hIGF-Iの部分ペプチドを合成した。合成したペプチドは、hIGF-Iの1-18番目(配列番号56、以下、p1-18と記す)、14-30番目(配列番号57、以下、p14-30と記す)、24-35番目(配列番号58、以下、p24-35と記す)、29-41番目(配列番号59、以下、p29-41と記す)、36-47番目(配列番号60、以下、p36-47と記す)、41-56番目(配列番号61、以下、p41-56と記す)、52-70番目(配列番号62、以下、p52-70と記す)、53-61番目(配列番号63、以下、p53-61と記す)、61-70番目(配列番号64、以下、p61-70と記す)に相当するペプチドであり、hIGF-Iの全長を網羅するように設計した。

上記ペプチドにおいては、内部に存在する Cys については、Ser あるいは Ala に置換した配列を合成した。また、41-56 番目に相当する配列については、内部の Cys を有する配列（配列番号 65、以下、p41-56C と記す）も合成した。

#### (2-2) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の抗原認識部位の解析

上記 (2-1) で合成した各種ペプチドを用いて、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の抗原認識部位の解析を以下に示す競合 ELISA で検討した。

参考例 1 (4) に示したように抗原を固定化したプレートを準備し、 $4.0 \mu\text{g/mL}$  に希釈した抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注後、 $50 \mu\text{g/mL}$  より 3 倍希釈で段階的に希釈した各種ペプチド溶液の単独あるいは種々の組合せ、あるいは hIGF-I を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、二次抗体として 4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウムの  $0.55 \text{g}$  を  $1 \text{L}$  の  $0.1 \text{M}$  クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1 \mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50 \mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 とした相対値 (%) で表示した。

結果を第 9 図に示した。第 9 図に示したように、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I により濃度依存的に阻害されたが、各種ペプチドでは、単独あるいは組合せに拘わらず、阻害活性は認められなかった。以上の結果は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 が、hIGF-I の単なるアミノ酸一次配列ではなく、hIGF-I の立体構造を認識していることを強く示唆する。

#### (3) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の競合的 ELISA による交差反応性の確認

精製した抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-II およびヒトインス

リンに対する交差反応性を、以下に示した競合 ELISA で検討した。抗原としては、hIGF-I (Pepro Tech 社製)、hIGF-II (Pepro Tech 社製) およびヒトインスリン (和光純薬社製) を使用した。

参考例 1 (1) で作製したメチル化 BSA-hIGF-I 抗原、あるいは参考例 1 (1) と同様に作製したメチル化 BSA-hIGF-II 抗原を、参考例 1 (4) 項に示した方法に従って、メチル化 BSA-hIGF-I 抗原は  $0.1\mu\text{g/mL}$  の濃度で、メチル化 BSA-hIGF-II 抗原は  $1.0\mu\text{g/mL}$  の濃度でそれぞれ固定化したプレートを準備し、 $0.6\mu\text{g/mL}$  に希釈した抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 を  $25\mu\text{L}$ /ウェルで分注後、 $20\mu\text{g/mL}$  より 4 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I、hIGF-II あるいはヒトインスリンを  $25\mu\text{L}$ /ウェルで分注し、混合して室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、二次抗体として抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の場合は、1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて使用した。反応後、Tween-PBS で洗浄後、ABTS 基質液 [2, 2'-アジノ-ビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) アンモニウム] の  $0.55\text{g}$  を  $1\text{L}$  の  $0.1\text{M}$  クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1\mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50\mu\text{L}$ /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。結果は、抗体のみを添加した時の OD415 を 100 として相対値 (%) で表示した。

結果を第 10 図に示した。第 10 図 A に示したように、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I に対する結合は、hIGF-I および hIGF-II で強く阻害された。同様に、第 10 図 B に示したように、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-II に対する結合は、hIGF-I および hIGF-II で強く阻害された。すなわち、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 は、hIGF-I と hIGF-II の両方に同程度の強さで反応できることを示している。一方、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I あるいは hIGF-II への結合は、ヒトインスリンでは阻害されなかった。

## (参考例 3)

## 抗 IGF 抗体と IGF との反応性の確認

抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 と二種類の市販抗 hIGF 抗体との、抗原への反応性の比較を以下のようにして検討した。抗体としては、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468、市販の抗 hIGF-I 抗体である sm1.2 (Upstate biotechnology 社製) および市販の抗 hIGF-II 抗体である S1F2 (Upstate biotechnology 社製) を用いた。抗原としては、hIGF-I (Pepro Tech 社製)、hIGF-II (Pepro Tech 社製) およびヒトインスリン (和光純薬社製) を使用した。

## (1) 表面プラズモン共鳴を用いた結合強度の測定

抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 と、抗原である hIGF-I あるいは hIGF-II に対する結合活性を解析するために、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468、市販の抗 hIGF-I 抗体 sm1.2、および市販の抗 hIGF-II 抗体 S1F2 の 3 種の抗体の、hIGF-I および hIGF-II に対する結合強度を表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) を利用したバイオセンサー-Biacore2000 (ピアコア社製) を用いて以下のように測定した。アナライトの希釈並びに測定中の反応緩衝液としては、HBS-EP (10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% Tween20 pH7.4) (ピアコア社製) を用いた。

センサーチップ CM-5 (ピアコア社製) に、アミンカップリング (ピアコア社製) を用いて、 $36.0\text{pg/mm}^2$  で hIGF-I をあるいは  $41.7\text{pg/mm}^2$  で hIGF-II を固定化し、測定物として  $20\mu\text{g/mL}$  より 2 倍希釈で 6 段階に希釈した 3 種類の抗体を、流速  $20\mu\text{L/分}$  で 2 分間添加した後、5 分間にわたって測定物の解離を観察した。反応は  $25^\circ\text{C}$  で行った。各濃度における結合反応曲線から、結合速度定数  $K_{\text{ass}}$ 、並びに解離速度定数  $K_{\text{diss}}$  を算出し、これから各抗体の結合定数  $K_A$  ( $\text{M}^{-1}$ ) を算出した。結合定数  $K_A$  は、 $K_A = K_{\text{ass}}/K_{\text{diss}}$  で計算される。結果を第 4 表に示した。

## 第 4 表

	KM1468	sm1.2	S1F2
$K_A$ (hIGF-I)	$7.86 \times 10^9$	$1.86 \times 10^8$	$4.62 \times 10^8$
$K_A$ (hIGF-II)	$8.63 \times 10^9$	$7.35 \times 10^7$	$2.40 \times 10^9$

抗hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I に対する  $K_A$  は  $7.86 \times 10^9 M^{-1}$  であり、hIGF-II に対する  $K_A$  は  $8.63 \times 10^9 M^{-1}$  であった。抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する  $K_A$  の比は、ほぼ 1:1 であり、抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 は hIGF-I および hIGF-II の両者に同程度に強力に結合できることが示された。一方、市販の抗hIGF-I モノクローナル抗体 sm1.2 の hIGF-I に対する  $K_A$  は  $1.86 \times 10^8 M^{-1}$ 、hIGF-II に対する  $K_A$  は  $7.35 \times 10^7 M^{-1}$  であった。抗hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する  $K_A$  は、市販の抗hIGF-I 抗体 sm1.2 の  $K_A$  と比較して hIGF-I に対しては約 42 倍、hIGF-II に対しては約 120 倍であった。また、市販の抗hIGF-II 抗体 S1F2 の hIGF-I に対する  $K_A$  は  $4.62 \times 10^8 M^{-1}$ 、hIGF-II に対する  $K_A$  は  $2.4 \times 10^9 M^{-1}$  であった。抗hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I および hIGF-II に対する  $K_A$  は、市販の抗hIGF-II 抗体 S1F2 の  $K_A$  と比較して hIGF-I に対しては約 18 倍、hIGF-II に対しては約 3.6 倍であった。すなわち抗hIGF ラットモノクローナル KM1468 は、市販の抗hIGF-I 抗体である sm1.2 および市販の抗hIGF-II 抗体である S1F2 と比較して、hIGF-I、hIGF-II のそれぞれに強い結合力を有していることが示された。

#### (参考例 4)

hIGF-I 発現細胞の増殖に対する抗hIGF ラットモノクローナル KM1468 の影響

##### (1) hIGF-I 発現細胞の構築

以下のようにしてヒト肺癌細胞株 A549 細胞 (ATCC CCL-185) に hIGF-I 遺伝子を導入した形質転換体を作製した。

(1-1) hIGF-I 遺伝子のクローニングおよび発現ベクターの作製

1×10<sup>7</sup>個のヒト肺癌細胞株 PC-9 細胞(British Journal of Cancer, 39, 15, 1976)から、RNA 調製キット RNeasy (QIAGEN 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、45.6μg の全 RNA を調製した。調製した全 RNA のうち 5μg を使用して、Superscript II (GIBCO-BRL 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、cDNA を合成した。

合成した cDNA を鋳型として、PCR によって hIGF-I 遺伝子をクローニングした。hIGF-I 遺伝子増幅用のプライマーとして、配列番号 66 と配列番号 67 に示した塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端にプラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製)、並びに pKANTEX93 (WO97/10354) ヘクローニングするための制限酵素認識配列を含んでいる。実際には、上述で得られたヒト肺癌細胞株 PC-9 細胞から合成した cDNA の 20ng を 50μL の KOD(+) DNA Polymerase 添付 KOD(+) Buffer 1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、2mM 塩化マグネシウム、1μM の配列番号 66 と 67 に示した塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94℃にて 1 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、94℃にて 30 秒間、62℃にて 30 秒間、72℃にて 30 秒間のサイクルを 30 サイクル行った。それぞれの反応液 50μL を制限酵素 EcoRI (Takara Shuzo 社製) および SalI (Takara Shuzo 社製) で消化後、アガロースゲル電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.5kb の hIGF-1 をコードする遺伝子の PCR 産物を回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 EcoRI および SalI で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (以下、CIAP と表記する; Takara Shuzo 社製) で末端を脱リン酸化して得られた DNA 0.1μg と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1μg を滅菌水に加えて 7.5μL とし、Ligation high (東洋紡績社製) 7.5μL を加えて 16℃で一晩反応させた。この

ようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株より各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を決定した。その結果、目的である hIGF-I をコードする遺伝子配列を有する第 11 図に示したプラスミド pBS(II)SK(-)/hIGF-I を得た。

次に、上記で得られた pBS(II)SK(-)/hIGF-I の hIGF-I をコードする遺伝子を含む制限酵素断片 (EcoRI-KpnI) と pKANTEX93 の EcoRI-KpnI 断片とを連結して、第 11 図に示したプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を構築した。プラスミド pKANTEX93/hIGF-I の塩基配列を上記と同様に塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 を用いて決定した。その結果、目的の hIGF-I をコードする遺伝子を含むプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を得た。

#### (1-2) hIGF-I 形質転換体の作製

上記(1-1)で得られたプラスミド pKANTEX93/hIGF-I を動物細胞に導入して、hIGF-I 発現細胞を以下のように作製した。

プラスミド pKANTEX93/hIGF-I を制限酵素 AatII (東洋紡績社製) で処理して直鎖状化した後、8 $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のヒト肺癌細胞株 A549 細胞 (ATCC CCL-185) へエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、15mL の RPMI 培地 [10% FCS、50 $\mu$ g/mL ゲンタマイシン (ナカライテスク社製) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製)] に懸濁し、T75 フラスコ (スミロン社製) に移した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した後、G418 を 0.2mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す A549/hIGF-I 形質転換株 (以下、A549/hIGF-I と表記する) が取得された。

#### (2) A549/hIGF-I 細胞の培養上清に産生された hIGF-I の定量

上記 (1) で作製した A549/hIGF-I 細胞内において導入した hIGF-I 遺伝子が発現して、該細胞が hIGF-I を産生しているかを確認するために、以下の実験を



行った。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養を行った後、培養上清を回収して、培養上清中に含まれる hIGF-I 量を以下の ELISA 法により測定した。

参考例 1 (4) に示した、メチル化 BSA-hIGF-I を固定化したプレートを準備し、陽性対象として  $2\mu\text{g/mL}$  より 5 倍希釈で段階的に希釈した hIGF-I、あるいは A549/hIGF-I 細胞または A549 細胞の培養上清を  $25\mu\text{l}$  /ウェルで分注後、BSA-PBS で  $0.6\mu\text{g/mL}$  に希釈した抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の精製抗体を分注し、混合して室温で 2 時間反応させた。反応後 Tween-PBS で洗浄後、1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製) を  $50\mu\text{L}$  /ウェルで分注し、室温 1 時間で反応させた。反応後、Tween-PBS で洗浄後、1000 倍希釈した抗ラット IgG-HRP (DAKO 社製) を  $50\mu\text{L}$  /ウェルで分注し、室温で 1 時間反応させた。反応後、Tween-PBS で 5 回洗浄した後、ABTS 基質溶液 [2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)アンモニウムの  $0.55\text{g}$  を  $1\text{L}$  の  $0.1\text{ M}$  クエン酸緩衝液 (pH4.2) に溶解し、使用直前に過酸化水素水を  $1\mu\text{L/mL}$  で添加した溶液] を  $50\mu\text{l}$  /ウェルで加えて発色させ、OD415 をプレートリーダー Emax を用いて測定した。

結果を第 12 図に示した。第 12 図 A に示したように、hIGF-I 遺伝子が導入されていない A549 細胞の培養上清に対して hIGF-I 遺伝子が導入された A549/hIGF-I 細胞の培養上清では、明らかに結合活性は低下していることから、A549/hIGF-I 細胞は hIGF-I を発現していることが示された。

(3) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I 発現細胞の増殖に対する影響

細胞自身が産生する hIGF-I に依存した細胞増殖 (以下オートクリン細胞増殖と表記する) を抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 が阻害できるかを、上記 (1) で作製した hIGF-I 遺伝子導入細胞 A549/hIGF-I 細胞を用いて、調べた。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を 10% FCS、 $50\mu\text{g/mL}$  ゲンタマイシン (ナ

カライテスク社製)を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen 社製) (以下、RPMI 培地と表記する) で培養した後、それぞれ  $2 \times 10^5$  個/mL の細胞密度になるように  $10 \mu\text{g/mL}$  のヒトトランスフェリン (GIBCO 社製)、 $200 \mu\text{g/mL}$  BSA (Invitrogen 社製) を含む DMEM/F12 培地(-FCS, -Phenol red) (Invitrogen 社製) (以下、無血清培地と表記する) に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液を 96 ウェルプレート (スミロン社製) に  $100 \mu\text{L}$ /ウェルで分注した後、各ウェルに無血清培地で  $200 \mu\text{g/mL}$  より 5 倍希釈系で段階的に希釈した抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を  $100 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で 5 日間培養した。培養後、細胞増殖試薬 WST-1 (Roche 社製) を  $20 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、さらに、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  インキュベーター内で 4 時間培養した後に、OD450 をプレートリーダー Emax (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

結果を第 13 図に示した。横軸は、培養時の各ウェル中の抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 濃度を示した。破線に示される抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 非添加の A549/hIGF-I 細胞の増殖性は、実線に示される hIGF-I を産生しない A549 細胞の増殖性と比較した場合、明らかに増加している。これは、A549/hIGF-I 細胞が自己産生する hIGF-I によって A549/hIGF-I 細胞自身の増殖を促すオートクリン増殖を示しているものである。この第 13 図に表されるようなオートクリン増殖は、A549/hIGF-I 細胞の培養時に抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を添加した場合に、濃度依存的に阻害された。一方、A549 細胞の増殖性には、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 は影響を及ぼさなかった。すなわち、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 は、細胞自身が生産する hIGF-I によるオートクリン細胞増殖を阻害できることが示された。

#### (4) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I 発現細胞の足場非依存性増殖への影響

癌化した細胞は、軟寒天中などの細胞接着のない浮遊状態にも関わらず増殖することができる足場非依存性増殖能を有している。この足場非依存性増殖能

は、細胞の造腫瘍性と非常に密接に関連しており、hIGF-I が関与していると考えられている。抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 が細胞の足場非依存性増殖を阻害できるかを、上記 (1) で作製した A549/hIGF-I 細胞を用いて、以下のようにして調べた。

暖めた 0.3% agar noble (Difco 社製) を含む、RPMI 培地 (以下、agar-RPMI 培地と記す) を、12 ウェルプレート (Costar 社製) に 1 mL/ウェルで分注し、数十分室温で放置してゲル化させたプレートを準備した。A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養した後、 $1 \times 10^3$  個/mL の細胞密度になるように暖めた agar-RPMI 培地に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液を、1 mL/ウェルで各ウェルに層積した。数分間室温で放置し、ゲル化させた後、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 週間培養した。培養後、各ウェル内に形成されたコロニー数を顕微鏡下で測定した。

結果を第 14 図に示した。第 14 図に示したように hIGF-I を産生する A549/hIGF-I 細胞の足場非依存性の細胞増殖性は、A549 細胞の足場非依存性の細胞増殖性と比較して上昇していた。また、A549/hIGF-I 細胞の軟寒天中での培養時に 10  $\mu$ g/mL の抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を添加した場合には、足場非依存性の細胞増殖は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の添加により完全に阻害された。すなわち、足場非依存性の細胞増殖には hIGF-I が関与しており、hIGF-I 依存的な足場非依存性の細胞増殖は、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 により阻害されることが示された。

(5) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I 発現細胞に対する腫瘍増殖阻害効果

上記 (1) で作製した A549/hIGF-I 細胞を用いて、hIGF-I が関与する in vivo 腫瘍形成に対する、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の腫瘍増殖阻害効果を、以下のように検討した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞を RPMI 培地で培養した後、それぞれ  $1 \times$

10<sup>6</sup> 個/mL の細胞密度になるように PBS に懸濁した。

A549/hIGF-I 細胞あるいは A549 細胞の細胞懸濁液の 100  $\mu$ L を 6 週齢、ヌードマウス Balb/c Ajc-1 nu (メス) の右胸部に皮下移植した。マウス 1 匹当たりの移植した細胞数は、1 $\times$ 10<sup>7</sup> 個となる。移植直後から、マウス 1 匹につき 500  $\mu$ g の抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を 1 週間に 2 回、合計 8 回にわたって尾静脈から投与した。陰性対象として、同一の腫瘍皮下移植マウスに対して PBS 投与を同時に行った。細胞移植から 5 日間経過時点から、腫瘍体積を測定した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) は、腫瘍の長径、短径および高さから、長径 $\times$ 短径 $\times$ 高さ $\times$ 0.5236 の式を用いて、算出した。

結果を第 15 図に示した。A549 細胞と hIGF-I を生産している A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスの中で、皮下腫瘍の増殖性を比較したとき、A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスの皮下腫瘍の方が、腫瘍の増殖は亢進していた。また、A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスでは、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を投与した場合、皮下腫瘍の増殖は、顕著に阻害された。このことは、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 が、hIGF-I の阻害により *in vivo* においても腫瘍の増殖を阻害できることを明確に示している。

#### (参考例 5)

##### 抗 hIGF 抗体 KM1468 の遺伝子クローニング

抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の V 領域をコードする cDNA を以下のようにして、単離、解析した。

##### (1) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 産生ハイブリドーマからの mRNA の調製

5 $\times$ 10<sup>7</sup> 個の抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 産生ハイブリドーマ細胞 KM1468(FERM BP-7978)より、mRNA の調製キットである Fast Track mRNA Isolation Kit (Invitrogen 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ KM1468 細胞由来の mRNA を 27  $\mu$ g 調製した。

(2) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の H 鎖および L 鎖 cDNA ライブラリーの作製

上記(1)で取得したハイブリドーマ KM1468 細胞の mRNA の 5  $\mu$ g から、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Amersham-Pharmacia 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、両端に EcoRI-NotI アダプター配列が連結された cDNA を合成した。合成した cDNA の全量を 20  $\mu$ L の滅菌水に溶解後、アガロースゲル電気泳動にて分画し、IgG クラス抗体の H 鎖に対応する約 1.5kb の cDNA 断片と  $\kappa$  クラスの L 鎖に対応する約 1.0kb の cDNA 断片を QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いてそれぞれ約 1.0  $\mu$ g 回収した。次に、 $\lambda$  ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) を用いて、VH と VL それぞれの cDNA 断片 0.1  $\mu$ g 相当と、キットに添付されている制限酵素 EcoRI で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase で末端を脱リン酸化された  $\lambda$  ZAPII ベクターの 1  $\mu$ g を、添付の使用説明書に従い、連結した。連結後のそれぞれの反応液のうち 2.5  $\mu$ L を Gigapack III Gold Packaging Extracts (Stratagene 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、入ファージにパッケージングし、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の H 鎖 cDNA ライブラリーとして  $5 \times 10^4$  個、L 鎖 cDNA ライブラリーとして  $4 \times 10^4$  個のファージクローンを取得した。次に、各々のファージを常法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) に従い、ナイロンメンブレンフィルター-Hybond-N+ (Amersham-Pharmacia 社製) 上に固定した。

(3) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の H 鎖および L 鎖の cDNA のクローニング

上記 (2) で作製した抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の H 鎖 cDNA ライブラリー、L 鎖 cDNA ライブラリーのナイロンメンブレンフィルターを、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham-Pharmacia 社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、マウス抗体の C 領域の cDNA [H 鎖はマウス C $\gamma$ 2b の cDNA 断片 (Nature, 283, 786 1980)、L 鎖はマウス C $\kappa$  の cDNA

断片 (Cell, 22, 197, 1980) ]をプローブとして検出し、プローブに強く結合したファージクローンを H 鎖、L 鎖各 10 クローン取得した。次に、 $\lambda$ ZAPII Predigested EcoRI/CIAP-Treated Vector Kit (Stratagene 社製) の使用説明書に従い、invivo excision 法により各ファージクローンをプラスミドに変換した。こうして得られた各プラスミドに含まれる cDNA の塩基配列を BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて、添付の使用説明書に従って反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて決定した。その結果、cDNA の 5' 末端に開始コドンと推定される ATG 配列が存在する完全長の機能的な H 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1468H5-2 および L 鎖 cDNA を含むプラスミド pKM1468L5-1 を得た。

#### (4) 抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の V 領域のアミノ酸配列の解析

プラスミド pKM1468H5-2 に含まれていた抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の全塩基配列を配列番号 1 に、それから推定された抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VH の全アミノ酸配列を配列番号 2 に、プラスミド pKM1468L5-1 に含まれていた抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の全塩基配列を配列番号 3 に、それから推定された抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の VL の全アミノ酸配列を配列番号 4 にそれぞれ示した。なお、配列番号 2 および 4 に記載したアミノ酸配列にそれぞれ対応する塩基配列は、配列番号 1 および 3 に記載したもの以外に無数に存在するが、それらはすべて本発明の範囲に包含される。既知の抗体の配列データ (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) との比較および精製した抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の VH および VL の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (Shimadzu 社製) を用いて解析した結果との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の H 鎖および L 鎖をコードする完全長 cDNA であり、VH については、配列番号 2 に示したアミノ酸配列の 1 から 19 番目が、

VLについては、配列番号4に示したアミノ酸配列の1から22番目が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

次に、抗hIGFラットモノクローナルKM1468のVHおよびVLのアミノ酸配列の新規性について検討した。配列解析システムとしてGCG Package(version 10.0、Genetics Computer Group社製)を用い、既存の蛋白質のアミノ酸配列データベース[SWISS-PROT (Release 39.0)、PIR-Protein (Release 65.0)]をBLAST法(Journal of Molecular Biology, 215, 403-410, 1990)により検索した。その結果、VHおよびVLともに完全に一致する配列は認められず、抗hIGFラットモノクローナルKM1468のVHおよびVLは新規なアミノ酸配列を有していることが確認された。

また、抗hIGFラットモノクローナルKM1468のVHおよびVLのCDRを、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468のVHのCDR1、2および3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号5、6および7に、VLのCDR1、2および3のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号8、9および10にそれぞれ示した。

#### (参考例6)

##### 抗hIGFヒト型キメラ抗体の作製

###### (1) 抗hIGFヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

WO97/10354に記載のヒトIgG1、 $\kappa$ クラスの抗体を発現できるヒト化抗体発現用ベクターpKANTEX93と参考例5(3)で得られた抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468のH鎖およびL鎖cDNAを含むプラスミドを用いて抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468に由来する抗hIGF-Iヒト型キメラ抗体発現ベクターを以下のようにして構築した。

まず、KM1468のVHおよびVLcDNAをアミノ酸配列が変化しないように発現ベクターpKANTEX93に挿入するため、PCRによって抗hIGFラットモノクローナル抗体KM1468のVHおよびVLcDNAを再構築した。プライマーとして、VHcDNA用に

配列番号 68 と配列番号 69 の塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を、VLcDNA 用に配列番号 70 と配列番号 71 の塩基配列をそれぞれ有する合成 DNA を設計した。それぞれの合成 DNA は 5' 末端に pKANTEX93 ヘクローニングするための制限酵素認識配列を含んでいる。実際には、参考例 5 (3) で得られたプラスミド pKM1468H5-2 の 20ng を 50  $\mu$ L の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 67 と 68 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、DNA サーマルサイクラー GeneAmp PCR System 9600 (PERKIN ELMER 社製) を用いて、94°C にて 3 分間加熱した後、2.5 単位の KOD DNA Polymerase (東洋紡績社製) を添加し、98°C にて 15 秒間、65°C にて 2 秒間、74°C にて 30 秒間のサイクルを 25 サイクル行った。同様に、参考例 5 (3) で得られたプラスミド pKM1468L5-1 の 20ng を 50  $\mu$ L の KOD DNA Polymerase 添付 PCR Buffer #1 (東洋紡績社製)、0.2mM dNTPs、1mM 塩化マグネシウム、0.5  $\mu$ M の配列番号 69 と 70 に示した塩基配列を有する合成 DNA を含む緩衝液に添加し、上記と同様の方法で PCR を行なった。それぞれの反応液 10  $\mu$ L をアガロースゲル電気泳動した後、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、約 0.5kb の VH の PCR 産物、約 0.43kb の VL の PCR 産物をそれぞれ回収した。

次に、プラスミド pBluescript II SK(-) (Stratagene 社製) を制限酵素 Sma I (Takara Shuzo 社製) で消化後、Calf Intestine Alkaline Phosphatase (以下、CIAP と表記する ; Takara Shuzo 社製) で末端を脱リン酸化して得られた DNA 0.1  $\mu$ g と、上記で得られたそれぞれの PCR 産物約 0.1  $\mu$ g を滅菌水に加えて 7.5  $\mu$ L とし、TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2 の solution I (Takara Shuzo 社製) 7.5  $\mu$ L、制限酵素 Sma I (Takara Shuzo 社製) 0.3  $\mu$ L を加えて 22°C で一晩反応させた。このようにして得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5  $\alpha$  株 (東洋紡績社製) を形質転換した。形質転換株より各プラスミド DNA を調製し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分



析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて塩基配列を決定した。こうして目的の塩基配列を有する第 16 図に示したプラスミド pKM1468VH および pKM1468VL を得た。

次に、上記で得られた pKM1468VH の VHcDNA を含む制限酵素断片 (NotI-ApaI) をヒト化抗体発現用ベクター pKANTEX93 の NotI-ApaI 部位に挿入し、第 17 図に示したプラスミド pKANTEX1468H を構築した。さらに、上記で得られた pKM1468VL の VLcDNA を含む制限酵素断片 (EcoRI-BsiWI) をプラスミド pKANTEX1468H の EcoRI-BsiWI 部位に挿入し、第 17 図に示したプラスミド pKANTEX1468Chi を構築した。プラスミド pKANTEX1468Chi を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社製) を用いて添付の説明書に従い、反応を行い、塩基配列自動分析装置 ABI PRISM 377 (Applied Biosystems 社製) を用いて VH および VLcDNA の塩基配列を決定した結果、目的の VH および VLcDNA がクローニングされたプラスミドが得られたことを確認した。

### (3) 抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の動物細胞を用いた安定発現

上記 (2) で得られた抗 hIGF キメラ抗体発現ベクター pKANTEX1468Chi を用いて抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の動物細胞での発現を以下のようにして行った。

プラスミド pKANTEX1468Chi を制限酵素 AatII (東洋紡績社製) で処理して直鎖状化した後、10  $\mu$ g を  $4 \times 10^6$  細胞のラットミエローマ細胞株 YB2/0 細胞 (ATCC CRL1581) ヘエレクトロポレーション法 (Cytotechnology, 3, 133-140, 1990) により導入後、40mL の H-SFM (5) 培地 [ FCS を 5% 含む H-SFM (Gibco BRL 社製) ] に懸濁し、96 ウェル培養プレート (住友ベークライト社製) に 200  $\mu$ L/ウェルずつ分注した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した後、G418 を 0.5mg/mL になるように添加して 1~2 週間培養した。G418 耐性を示す形質転換体のコロニーが出現し、コンフルエントになったウェルより培養上清を回収し、上清中の抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の濃度を後述の本参考例(5)に示す結合 ELISA により測定した。

培養上清中に抗 hIGF キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換体については、dhfr 遺伝子増幅系を利用して抗体発現量を増加させる目的で、G418 を 0.5mg/mL、dhfr 遺伝子産物の DHFR の阻害剤である MTX (SIGMA 社製) を 50nM 含む H-SFM(5)に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL になるように懸濁し、24 ウェル培養プレート (Greiner 社製) に 1mL ずつ分注した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1~2 週間培養して、50nM MTX 耐性を示す形質転換体を誘導した。形質転換体がウェルにコンフルエントになった時点で培養上清中の抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の濃度を後述の本参考例(5)に示す結合 ELISA により測定した。培養上清中に抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の発現が認められたウェルの形質転換体については、上記と同様の方法により、MTX 濃度を 100nM、200nM と順次上昇させ、最終的に G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM の濃度で含む H-SFM(5)で増殖可能かつ、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体を高発現する形質転換体を得た。得られた形質転換体については、2 回の限界希釈法による単一細胞化を行い、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体の発現の最も高い形質転換体を得た。抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 に由来する抗 hIGF ヒト型キメラ抗体産生形質転換細胞株としては、形質転換体 KM3002 があげられる。なお、形質転換体 KM3002 は、平成 14 年 4 月 2 日付けで独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 郵便番号 305-8566) に FERM BP-7996 として寄託されている。

#### (4) 抗 hIGF キメラ抗体の培養上清からの精製

参考例 5 (3) で得られた抗 hIGF ヒト型キメラ抗体を発現する形質転換細胞株 KM3002 を、G418 を 0.5mg/mL、MTX を 200nM、Daigo's GF21 (和光純薬社製) を 5%の濃度で含む H-SFM に  $1 \sim 2 \times 10^5$  細胞/mL となるように懸濁し、175cm<sup>2</sup> フラスコ (Greiner 社製) に 100mL ずつ分注した。37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5~7 日間培養し、コンフルエントになった時点で培養上清を回収した。培養上清約 1L より Prosep-A (Bioprocessing 社製) カラムを用いて、添付の説明書に従い、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 を精製し、約 10.2mg の精製蛋白質を取

得した。得られた抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の約 4 $\mu$ g を、公知の方法 (Nature, 227, 680-685, 1970) に従って電気泳動し、分子量および精製度を調べた。その結果を第 18 図に示した。精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 は、非還元条件下では分子量が約 150 キロダルトン (以下、Kd と表記する) の 1 本のバンドが、還元条件下では約 50Kd と約 25Kd の 2 本のバンドが認められた。これらの分子量は、IgG クラスの抗体は、非還元条件下では分子量は約 150Kd であり、還元条件下では分子内の S-S 結合が切断され、約 50Kd の分子量を持つ H 鎖と約 25Kd の分子量を持つ L 鎖に分解されるという報告 (Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press Limited, 1996) と一致し、抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 が正しい構造の抗体分子として発現されていることが確認された。また、精製した抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列をプロテインシーケンサー PPSQ-10 (Shimadzu 社製) を用いて解析した結果、抗 hIGF 抗体 KM1468 の H 鎖および L 鎖の N 末端アミノ酸配列と一致することを確認した。

#### (5) 抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の hIGF に対する反応性

抗 hIGF ラット抗体 KM1468 および抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 の hIGF-I に対する反応性を参考例 1 (4) に示した ELISA により検討した。ただし、ELISA プレートに固定化したメチル化 BSA-hIGF-I の濃度は、0.5 $\mu$ g/mL、二次抗体として、ラット抗体の場合は、4000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラット Ig 抗体 (DAKO 社製)、キメラ抗体の場合は、1000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG1 抗体 (Southern Biotechnology 社製) を用いて行った。第 19 図に示したように、抗 hIGF キメラ抗体 KM3002 は、hIGF-I に対する抗体濃度依存的な結合活性を示した。また、その活性は、二次抗体が異なるため、直接の比較は困難であるが、抗 hIGF ラット抗体 KM1468 と同等であることが示唆された。

### 産業上の利用可能性

本発明は、ヒトインスリン様成長因子-I（以下、hIGF-I と記す）およびヒトインスリン様成長因子-II（以下、hIGF-II と記す）と特異的にかつ同程度の強さで結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の生物活性を阻害する能力を有する遺伝子組換え抗体または該抗体断片、該抗体または該抗体断片を生産する形質転換体、該抗体または該抗体断片の製造法および該抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬を提供することを目的とする。

### 図面の簡単な説明

第1図は、プラスミド pBS/CamHV0 および pBS/LV0 の造成工程を示した図である。

第2図は、プラスミド pKANTEX93/CamHV0/LV0 の造成工程を示した図である。

第3図は、抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF-I に対する特異的な反応性を示した図である（結合 ELISA）。横軸は抗体濃度を、縦軸は結合活性を吸光度（415nm）でそれぞれ示す。a には、□で示した抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002、○で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0、△で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QAR/LV0、■で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0 および●で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/NYPLL3A11 の結果を、b には□で示した抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002、○で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0、◇で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0、△で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11、●で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT および■で示した抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT の結果をそれぞれ示す。

第4図は、抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF-I または hIGF-II 依存的な細胞増殖阻害効果を示した図である。a は 10ng/mL の hIGF-I 存在下、b は 20ng/mL の hIGF-II 存在下での結果をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度（ $\mu\text{g/mL}$ ）、縦軸が細胞の増殖の値を吸光度（OD450nm）でそれぞれ示す。図中実線は hIGF-I または hIGF-II

添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインを、破線は hIGF-I または hIGF-II 非添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインをそれぞれ示す。□ は抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002、○は抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0、△ は抗 hIGFCDR 移植抗体 QAR/LV0、■は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0 の結果をそれぞれ示す。

第 5 図は、抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF-I または hIGF-II 依存的な細胞増殖阻害効果を示した図である。a は 10ng/mL の hIGF-I 存在下、b は 20ng/mL の hIGF-II 存在下での結果をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸が細胞の増殖の値を吸光度 (OD450nm) でそれぞれ示す。図中実線は hIGF-I または hIGF-II 添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインを、破線は hIGF-I または hIGF-II 非添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインをそれぞれ示す。□ は抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002、○は抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/LV0、△ は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0、◇は抗 hIGFCDR 移植抗体 CamHV0/NYPLL3A11、■は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 の結果をそれぞれ示す。

第 6 図は、抗 hIGFCDR 移植抗体の hIGF-I または hIGF-II 依存的な細胞増殖阻害効果を示した。a は 10ng/mL の hIGF-I 存在下、b は 20ng/mL の hIGF-II 存在下での結果をそれぞれ示した。横軸が抗体濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸が細胞の増殖の値を吸光度 (OD450nm) でそれぞれ示す。図中実線は hIGF-I または hIGF-II 添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインを、破線は hIGF-I または hIGF-II 非添加かつ抗体非添加時の細胞増殖のベースラインをそれぞれ示す。□ は抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002、◇は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/LV0、■は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLDFT、●は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/PLLDFT、▲は抗 hIGFCDR 移植抗体 QGAR/NYPLL3A11 の結果をそれぞれ示す。

第 7 図は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体の hIGF-I に対する特異的な反応性を示した図である (結合 ELISA)。図中、黒塗りのバーはメチル化 BSA-hIGF-I を抗原に、白抜きのバーはメチル化 BSA-BSA を抗原に用いた時の結果を示す。

第 8 図は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体の液相系における天然の立体構

造を有する hIGF-I に対する反応性を示した図である (競合 ELISA)。◇は抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468、■は抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1470、△は抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1471、×は抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1472、○は抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1473 の結果をそれぞれ示す。

第 9 図は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の hIGF-I に対する結合における各種ペプチドによる阻害活性を示した図である。横軸は各種ペプチド濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸は結合活性 (%) をそれぞれ示す。A には●で示した p1-18、□で示した p24-35、■で示した p29-41、△で示した p36-47、◇で示した p61-70、◆で示した p14-30、×で示した p41-56 の結果を、B には○で示した hIGF-I、●で示した p41-56C、□で示した p52-70、■で示した p1-18 および p41-56C、△で示した p1-18 および p52-70、▲で示した p41-56C および p52-70、◇で示した p1-18、p41-56C および p52-70 の結果をそれぞれ示す。

第 10 図は、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の hIGF-I および hIGF-II への結合に対する、hIGF-I、hIGF-II およびヒトインスリンでの阻害活性を示した図である。A が抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 と hIGF-I との結合、B が抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 と hIGF-II との結合に対する各因子による阻害をそれぞれ示す。横軸が各種因子濃度 ( $\mu\text{g/mL}$ )、縦軸が因子非添加時を 100% としたときの結合活性 (%) を示す。■は hIGF-I、○は hIGF-II、△はヒトインスリンの結果をそれぞれ示す。

第 11 図は、プラスミド pBS(II)SK(-)/hIGF-1 および pKANTEX93/hIGF-I の造成工程を示した図である。

第 12 図は、A549/hIGF-I 細胞における hIGF-I の発現を示した図である。A は、組換え hIGF-I 蛋白質による阻害度を示す。横軸は添加した組換え hIGF-I 蛋白質の濃度、縦軸は結合活性 (OD415) を示す。破線は組換え hIGF-I 蛋白質非添加時の結果を示す。B は、A549 細胞および A549/hIGF-I 細胞の培養上清中に含まれる hIGF-I を示す。白抜きは A549 細胞、網掛けは A549/hIGF-I 細胞を

それぞれ示す。

第13図は、抗hIGFラットモノクローナル抗体 KM1468 の hIGF-I 発現細胞に対する細胞増殖阻害効果を示した図である。破線は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 非添加の A549/hIGF-I 細胞の増殖性を、実線は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 非添加の A549 細胞の細胞増殖をそれぞれ示す。■は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を添加した A549/hIGF-I 細胞の増殖性を、○は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を添加した A549 細胞の増殖性をそれぞれ示す。

第14図は、抗 hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 の足場非依存性増殖阻害効果を示した図である。図中の白抜きのカラムは A549 細胞のコロニー形成数を、網掛けのカラムは A549/hIGF-I 細胞の形成数を、黒塗りのカラムは抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 を添加した A549/hIGF-I 細胞の形成数をそれぞれ示す。

第15図は、抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 の抗腫瘍効果を示した図である。横軸は腫瘍移植後の経過日数を、縦軸は腫瘍体積をそれぞれ示す。A549 細胞を移植したマウスのうち、●は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 非添加時を、○は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 添加時をそれぞれ示す。A549/hIGF-I 細胞を移植したマウスのうち、■は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 非添加時を、□は抗 hIGF ラットモノクローナル KM1468 添加時をそれぞれ示す。

第16図は、プラスミド pKM1468VH および pKM1468VL の造成工程を示した図である。

第17図は、プラスミド pKANTEX1468Chi の造成工程を示した図である。

第18図は、精製した抗 hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の SDS-PAGE (4~15% グラジエントゲルを使用) の電気泳動パターンを示した図である。左側が非還元条件、右側が還元条件でそれぞれ電気泳動を行った図である。レーン M が非

還元時は高分子量マーカーおよび還元時は低分子量マーカー、レーン1が抗hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の泳動パターンをそれぞれ示す。

第19図は、抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468 および抗hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の hIGF-I に対する反応をそれぞれ示す。横軸が抗体濃度 ( $\mu$ g/mL)、縦軸が結合活性 (OD415) をそれぞれ示す。○が抗hIGF ラットモノクローナル抗体 KM1468、●が抗hIGF ヒト型キメラ抗体 KM3002 の反応性をそれぞれ示す。

#### 配列表フリーテキスト

配列番号 13-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 16-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 17-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 18-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 19-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 20-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 21-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 22-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 23-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 24-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 25-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 30-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 31-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 32-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 33-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 34-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 35-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 36-人工配列の説明：合成 DNA



配列番号 37-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 38-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 39-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 40-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 41-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 42-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 43-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 44-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 45-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 46-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 47-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 48-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 49-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 50-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 51-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 52-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 53-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 66-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 67-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 68-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 69-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 70-人工配列の説明：合成 DNA

配列番号 71-人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. ヒトインスリン様成長因子-I (IGF-I) およびヒトインスリン様成長因子-II (IGF-II) と特異的に結合し、ヒト IGF-I およびヒト IGF-II の生物活性を阻害する能力を有する遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
2. ヒト IGF-I およびヒト IGF-II に対する結合の強さが同程度である請求の範囲 1 に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
3. バイオセンサーピアコアで測定されるヒト IGF-I およびヒト IGF-II に対する結合定数が  $1 \times 10^9 \text{M}^{-1}$  以上である請求の範囲 1 または 2 に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
4. 抗体分子のクラスが IgG である、請求の範囲 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
5. 遺伝子組換え抗体が、ヒト IGF に対するモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) の相補性決定領域 (CDR) を含む、請求の範囲 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
6. 遺伝子組換え抗体、または抗体断片の VH の相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7 で表される請求の範囲 5 に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
7. 遺伝子組換え抗体または抗体断片の VL の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で表される請求の範囲 5 に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
8. 遺伝子組換え抗体、または抗体断片の VH の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 5、6 および 7 で表され、VL の CDR 1、CDR2 および CDR3 が、それぞれ配列番号 8、9 および 10 で表される請求の範囲 5 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
9. 遺伝子組換え抗体または該抗体活性断片の VH が、配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、

77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

10. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

11. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列、および VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、

82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列または配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む請求の範囲 5 ～ 10 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

12. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 11 で表されるアミノ酸配列のうち 1 番目の Gln、11 番目の Val、42 番目の Gly、75 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列、および VL が、配列番号 14 で表されるアミノ酸配列のうち、4 番目の Met、9 番目の Asp、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Leu、22 番目の Asn、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Pro、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Val、84 番目の Val から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む請求の範囲 5 ～ 11 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

13. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 54 で表されるアミノ酸配列のうち 49 番目の Ser、77 番目の Asn、84 番目の Asn、93 番目の Val、97 番目の Ala、98 番目の Arg から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含み、かつ VL が、配列番号 55 で表されるアミノ酸配列のうち 4 番目の Met、9 番目の Ser、10 番目の Ser、11 番目の Leu、15 番目の Val、35 番目の Tyr、39 番目の Pro、42 番目の Ala、45 番目の Leu、46 番目の Leu、69 番目の Asp、70 番目の Phe、71 番目の Thr、82 番目の Phe から選ばれる少なくとも 1 つのアミノ酸が置換されたアミノ酸配列を含む請求の範囲 5 ～ 11 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。

14. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8 または 12 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
15. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VL が配列番号 27、28 または 29 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8 または 12 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
16. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ VL が配列番号 27、28 または 29 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8、12、14 または 15 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
17. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ VL が配列番号 27 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8、12、14～16 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
18. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ VL が配列番号 28 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8、12、14～16 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
19. 遺伝子組換え抗体または該抗体断片の VH が配列番号 26 で表されるアミノ酸配列を含み、かつ VL が配列番号 29 で表されるアミノ酸配列を含む請求の範囲 5～8、12、14～16 のいずれかに 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
20. 遺伝子組換え抗体がヒト型 CDR 移植抗体である請求の範囲 1～19 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片。
21. 抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体 (scFv)、二量体化可変領域 (diabody)、ジスルフィド安定化可変領域 (dsFv) および CDR を含むペプ

チドから選ばれる抗体断片である請求の範囲 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の抗体断片。

22. 請求の範囲 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片をコードする DNA。

23. 請求の範囲 22 に記載の DNA を含有する発現ベクター。

24. 請求の範囲 23 に記載の発現ベクターを導入して得られる形質転換体。

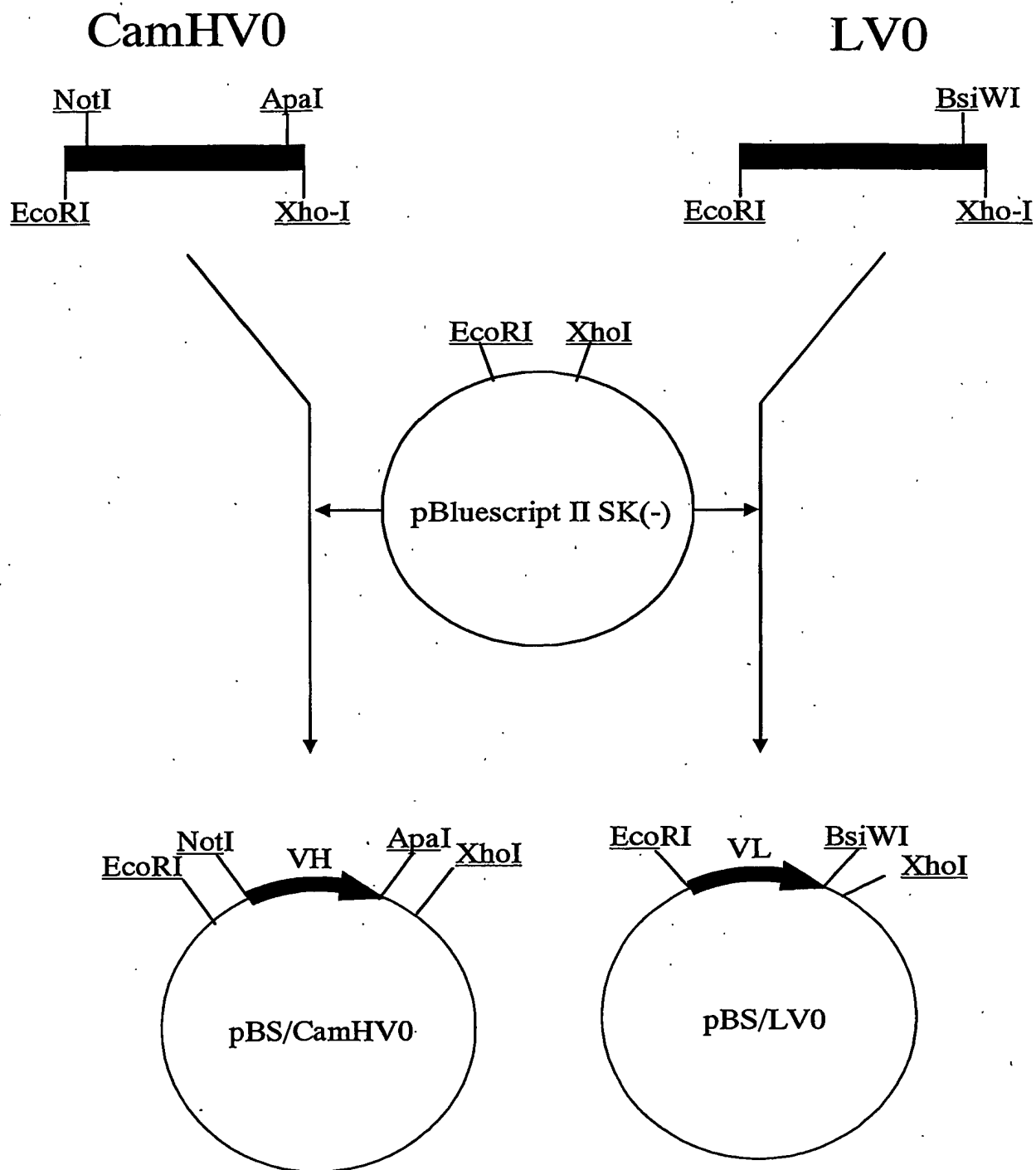
25. 請求の範囲 24 に記載の形質転換体を培地中で培養し、培養物中に請求項 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を生成蓄積させ、該培養物から該遺伝子組換え抗体または該抗体断片を単離し、精製する工程を含む、遺伝子組換え抗体または該抗体断片を製造する方法。

26. 請求の範囲 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を有効成分として含有する医薬。

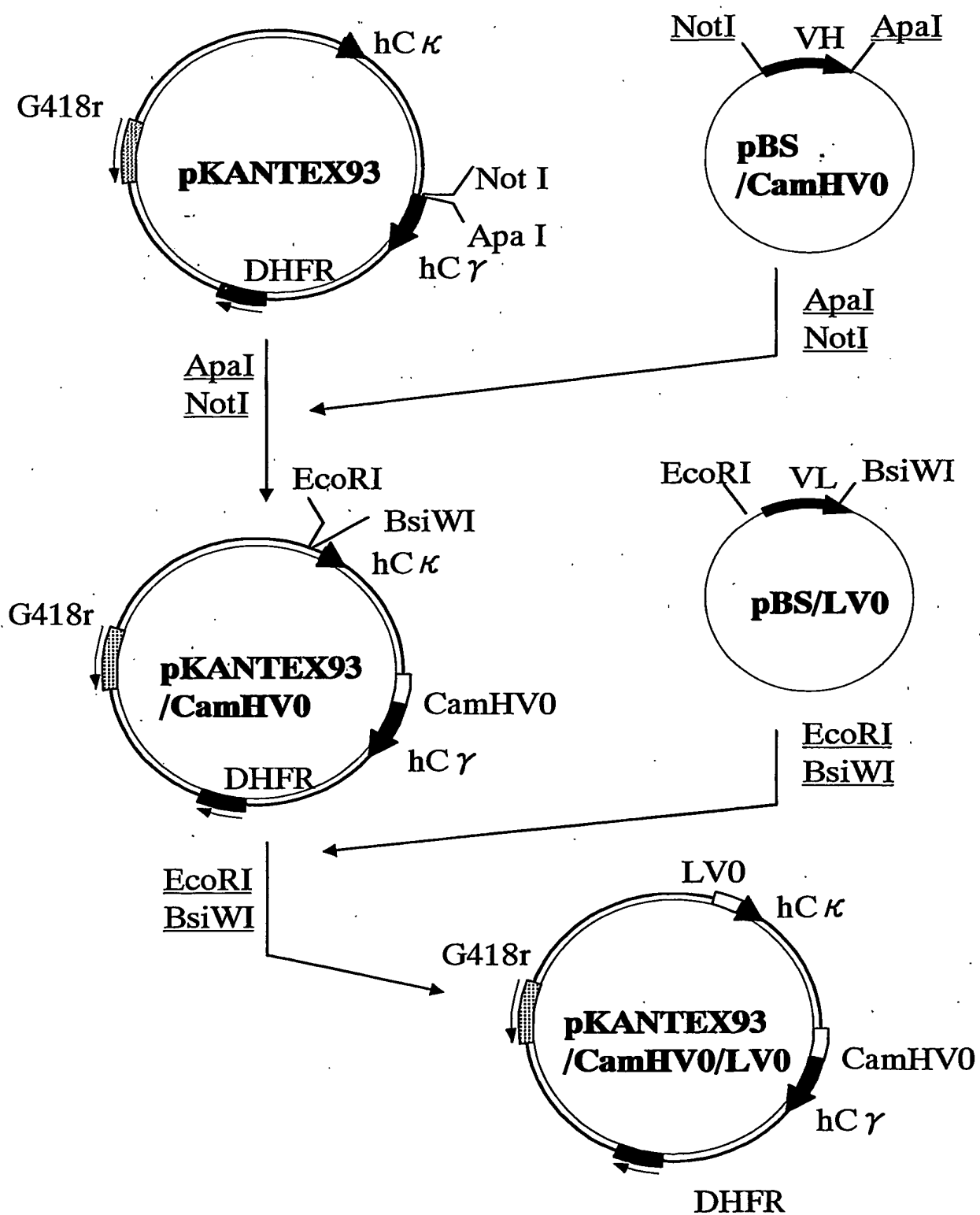
27. 請求の範囲 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載の遺伝子組換え抗体または該抗体断片を有効成分として含有する IGF 関連疾患の治療薬。

28. IGF 関連疾患が、癌、末端肥大症および糖尿病性合併症である請求項 27 に記載の治療薬。

# 第1図

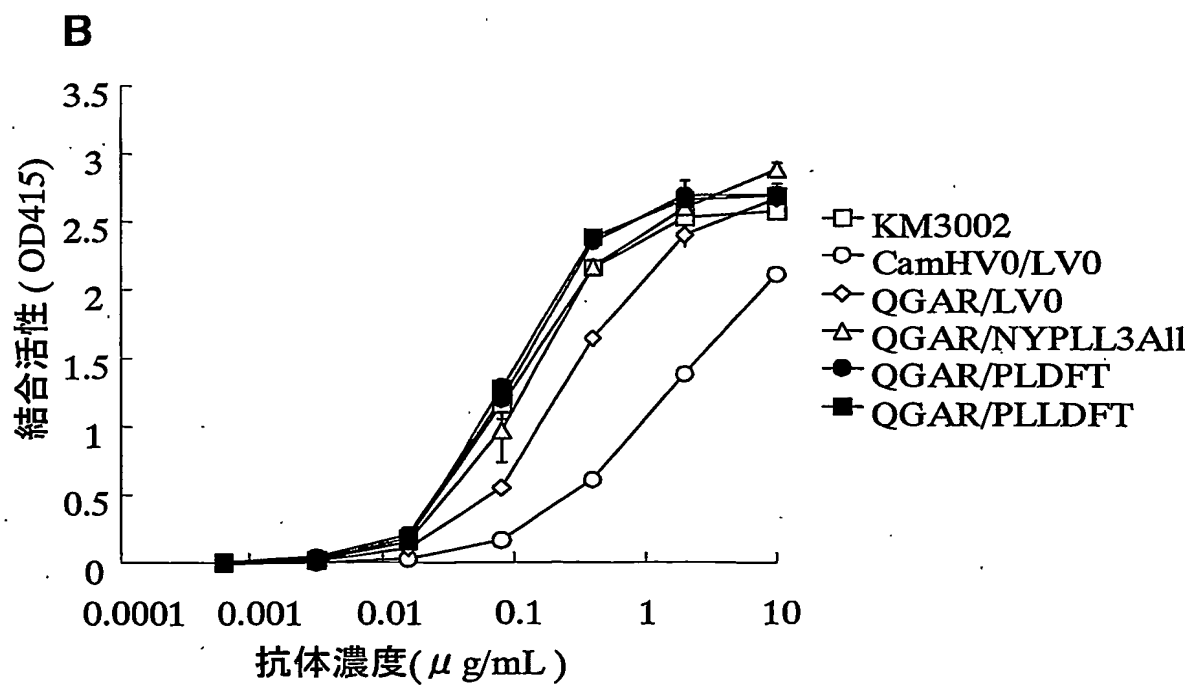
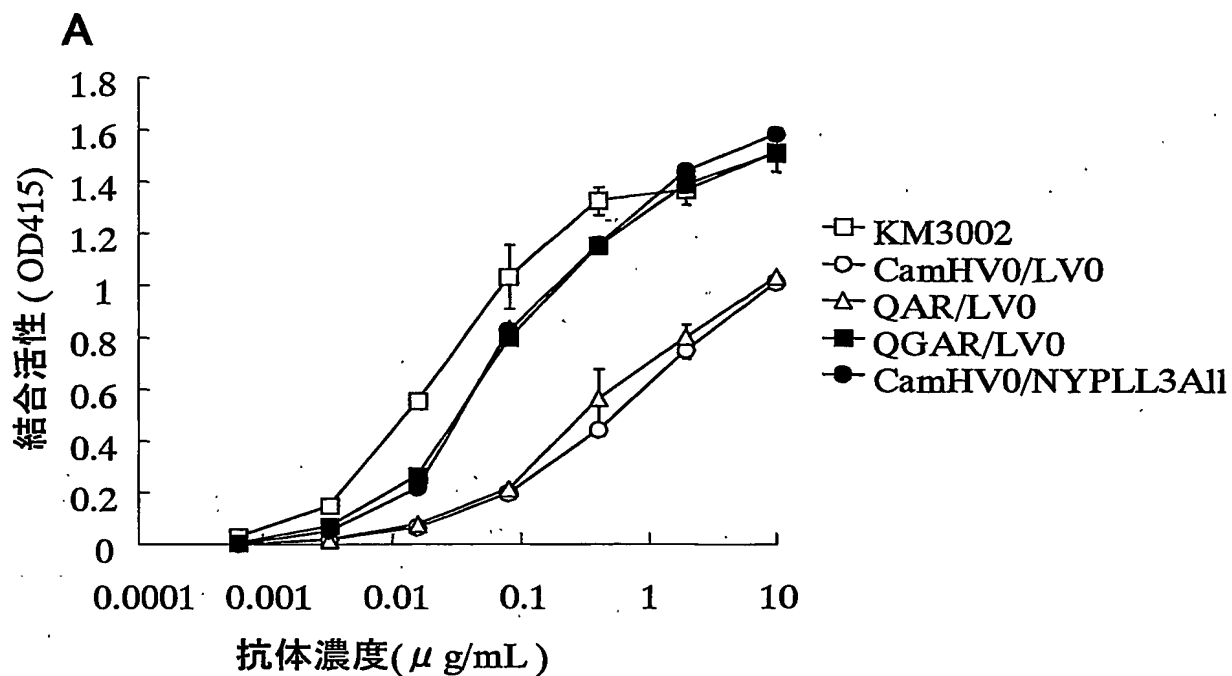


## 第2図



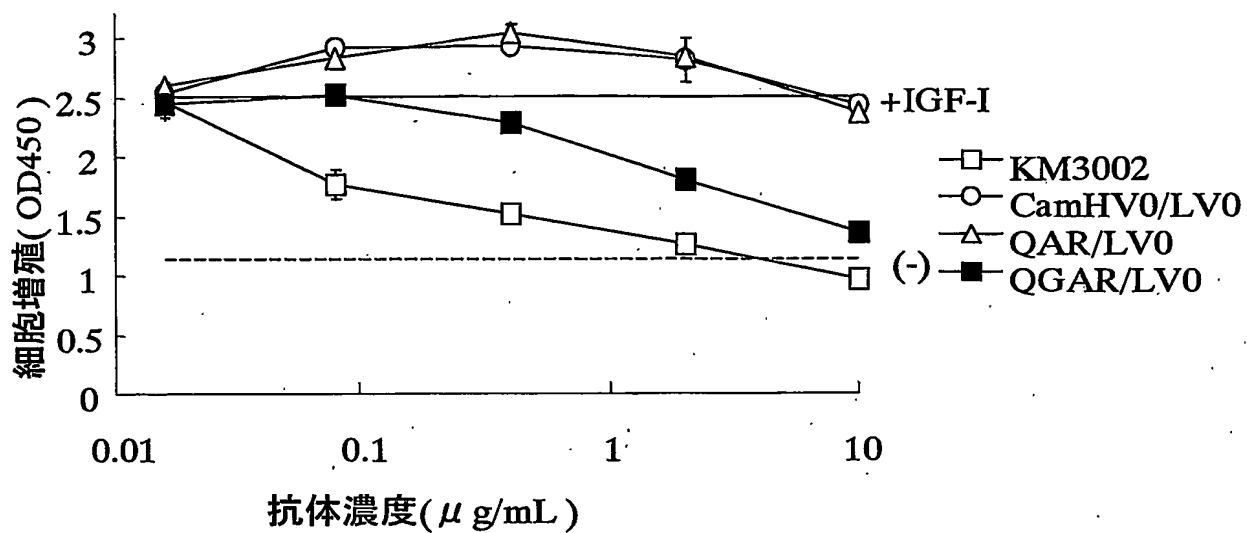


## 第3図

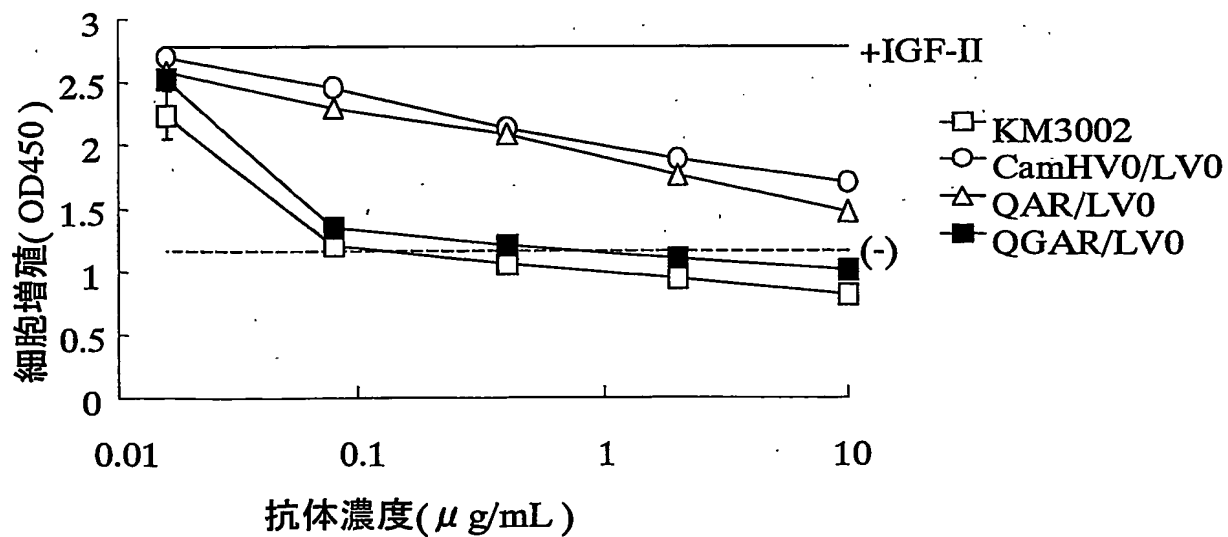


## 第4図

A

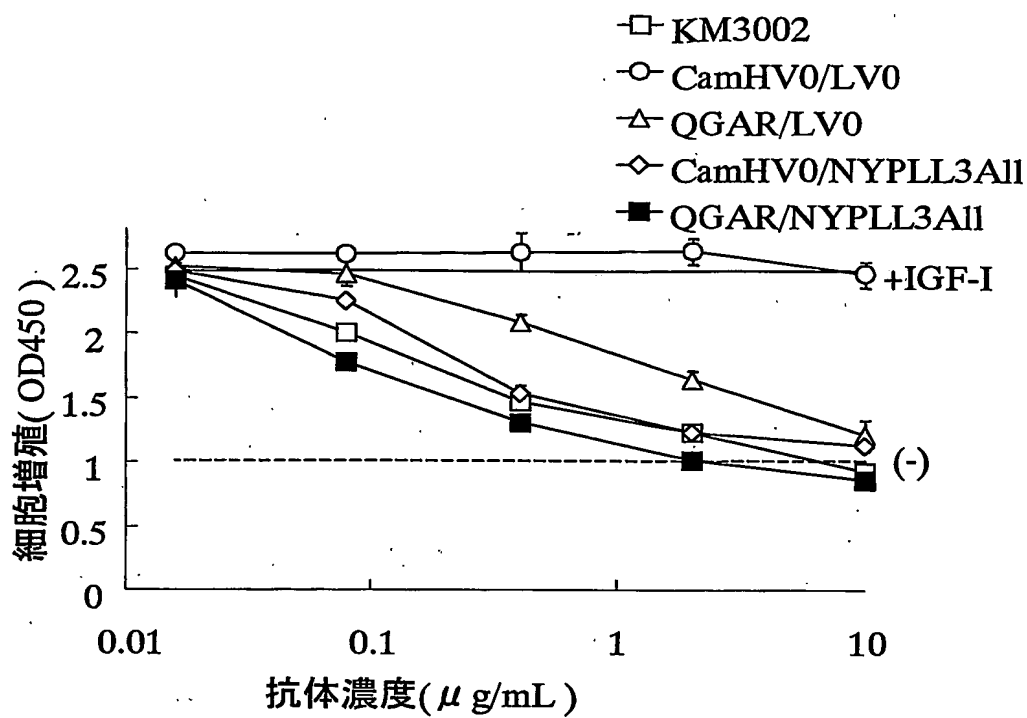


B

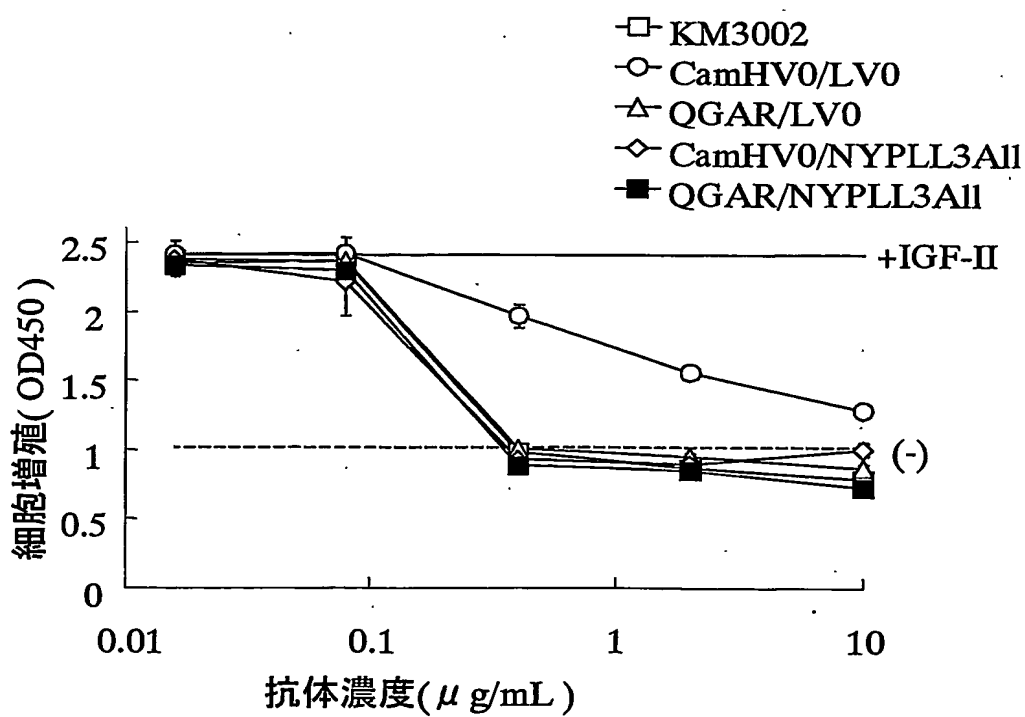


## 第5図

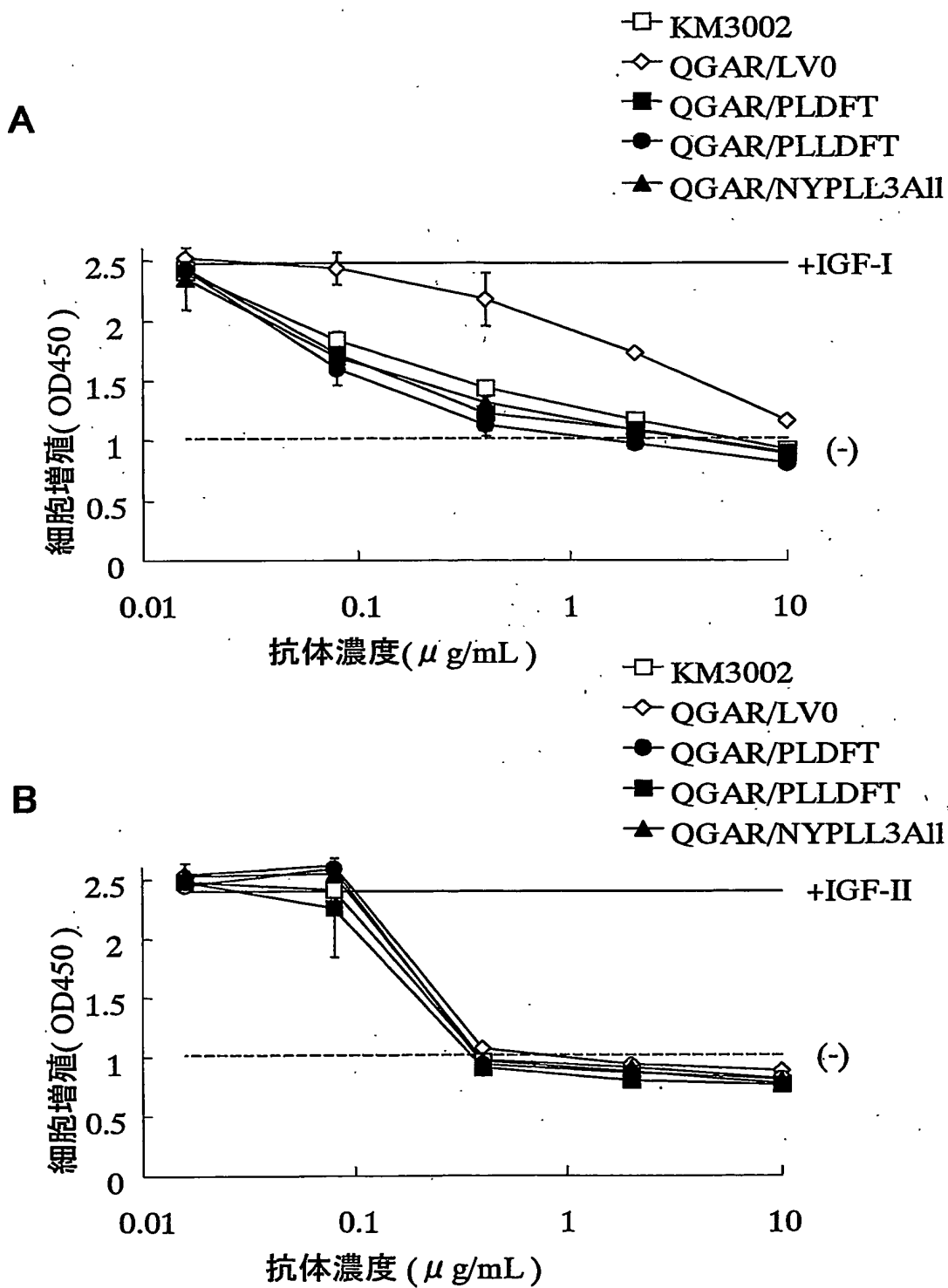
A



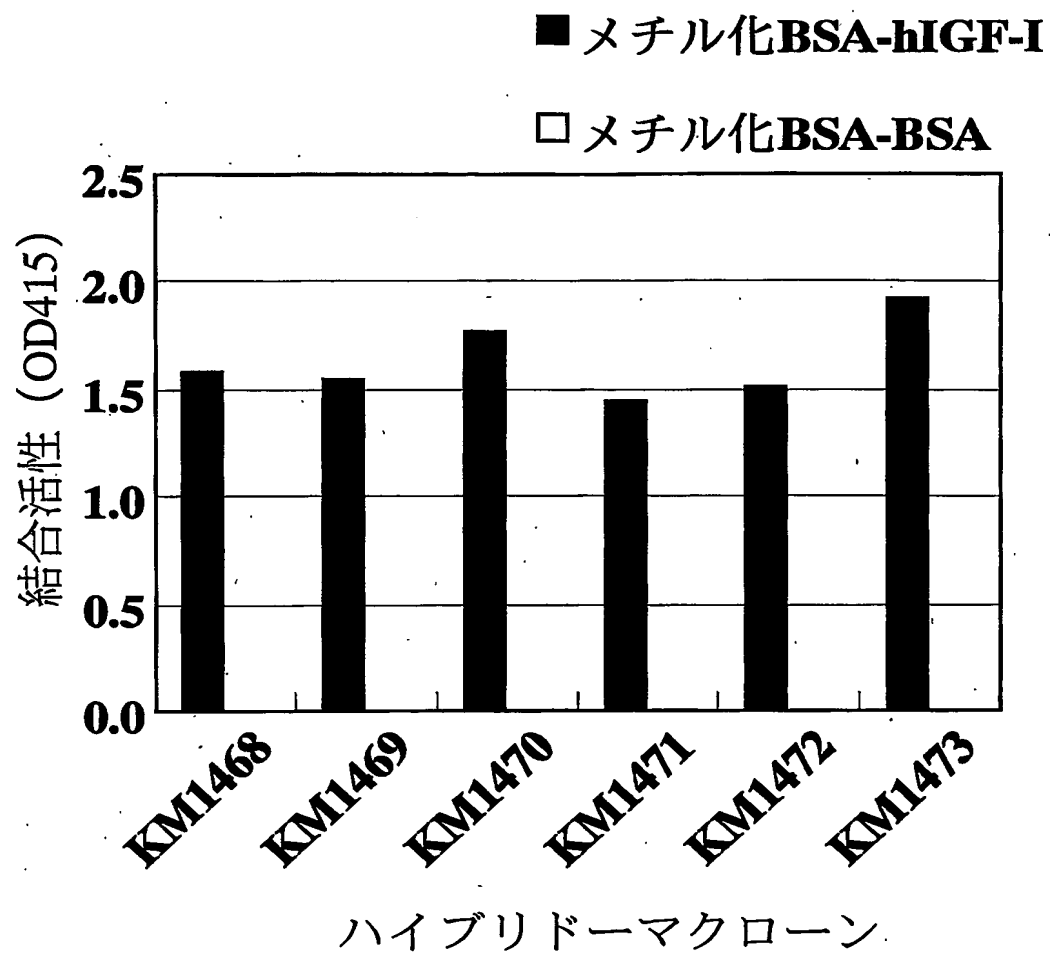
B



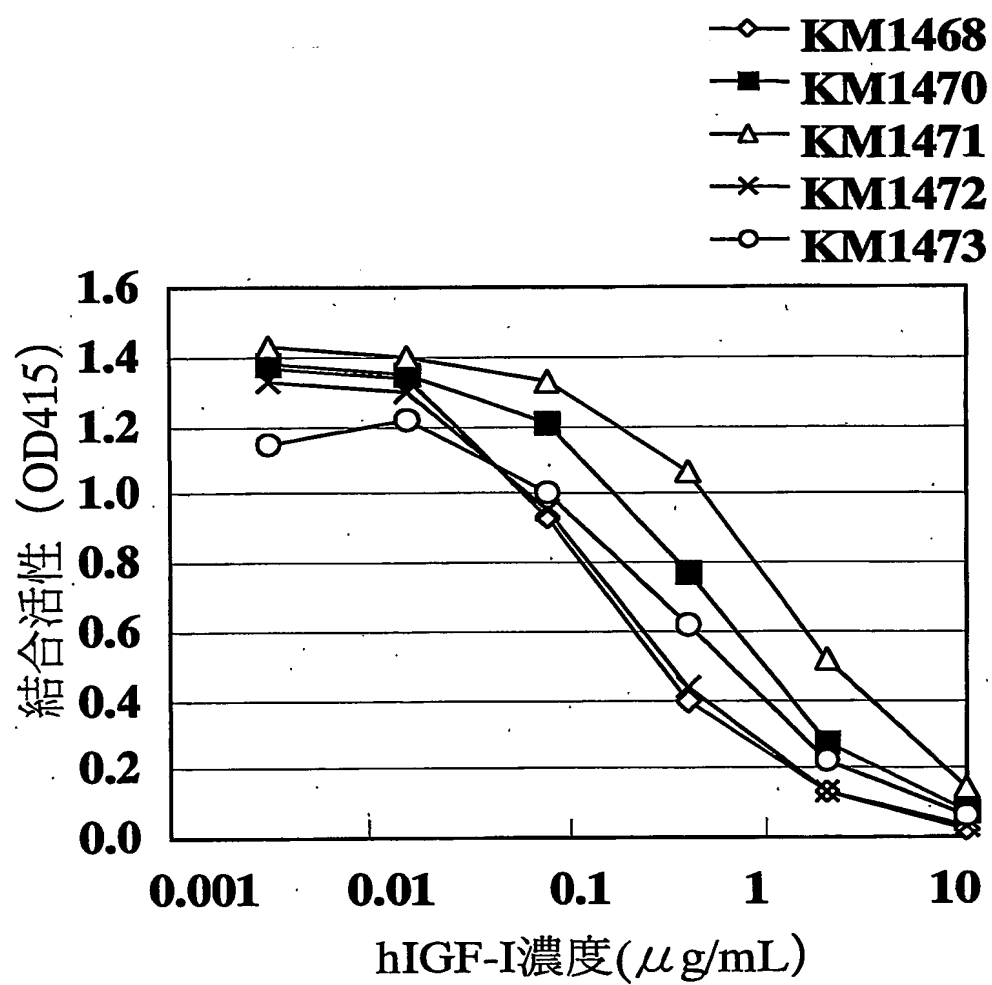
## 第6図



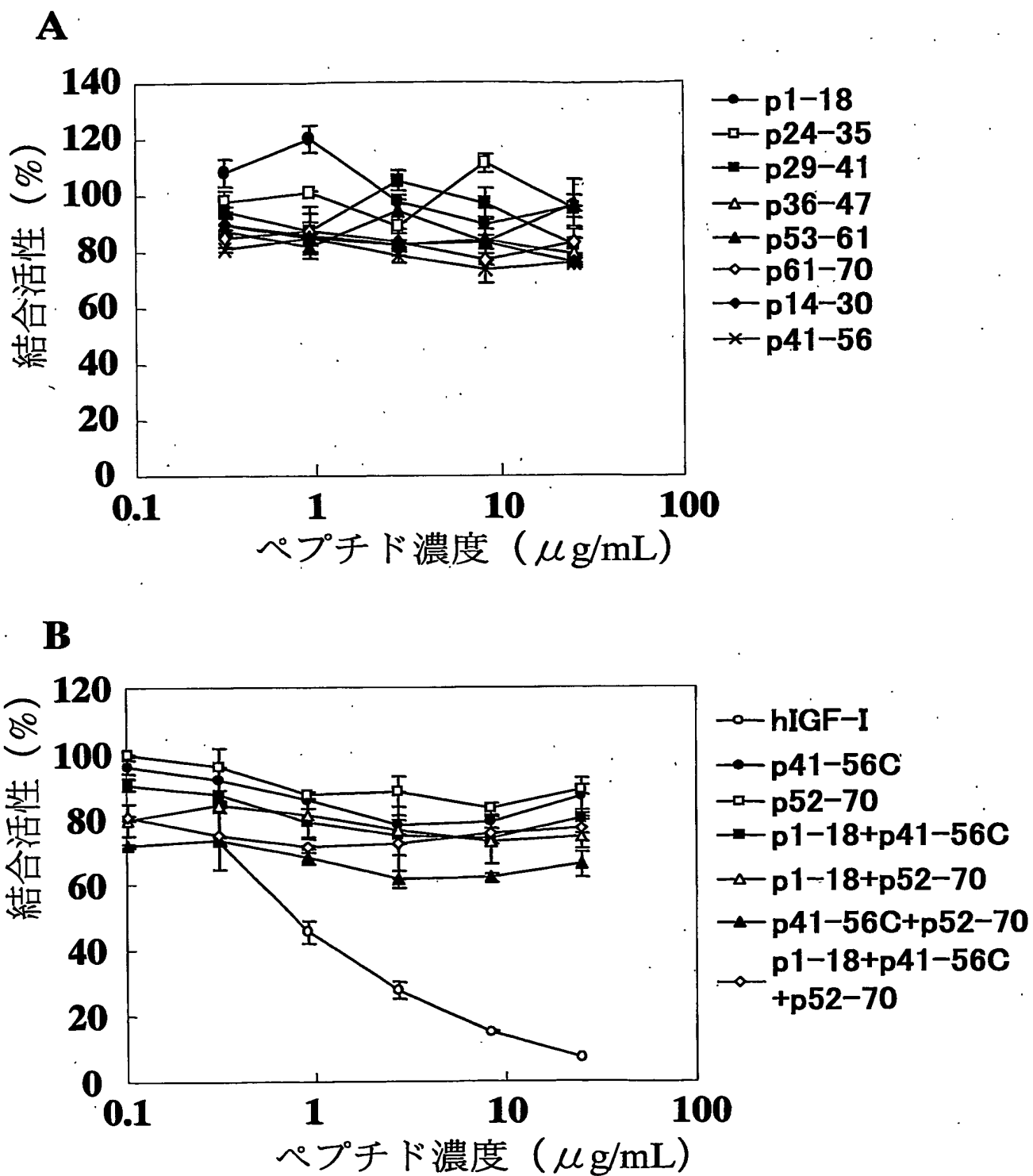
## 第7図



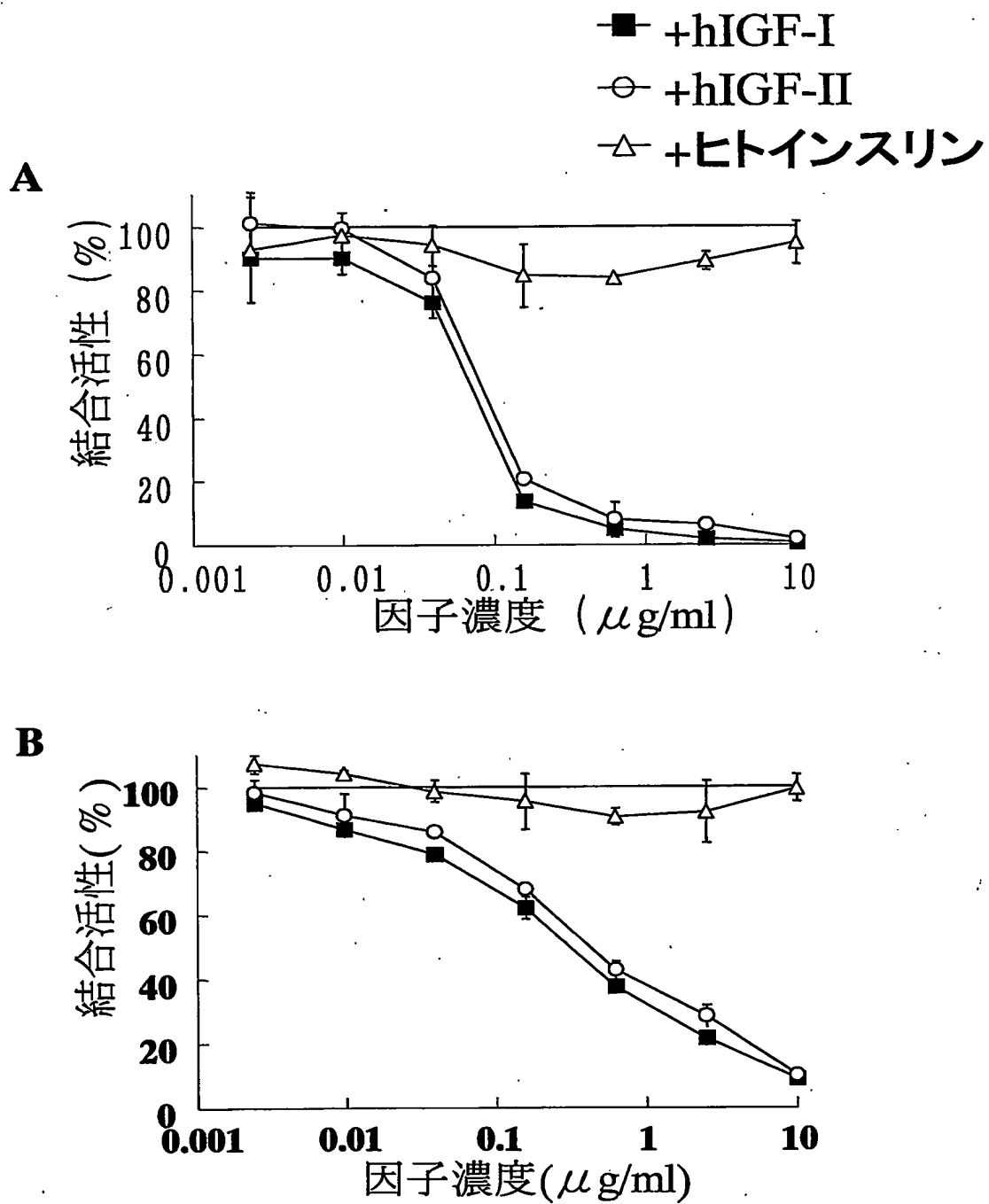
第8図



## 第9図

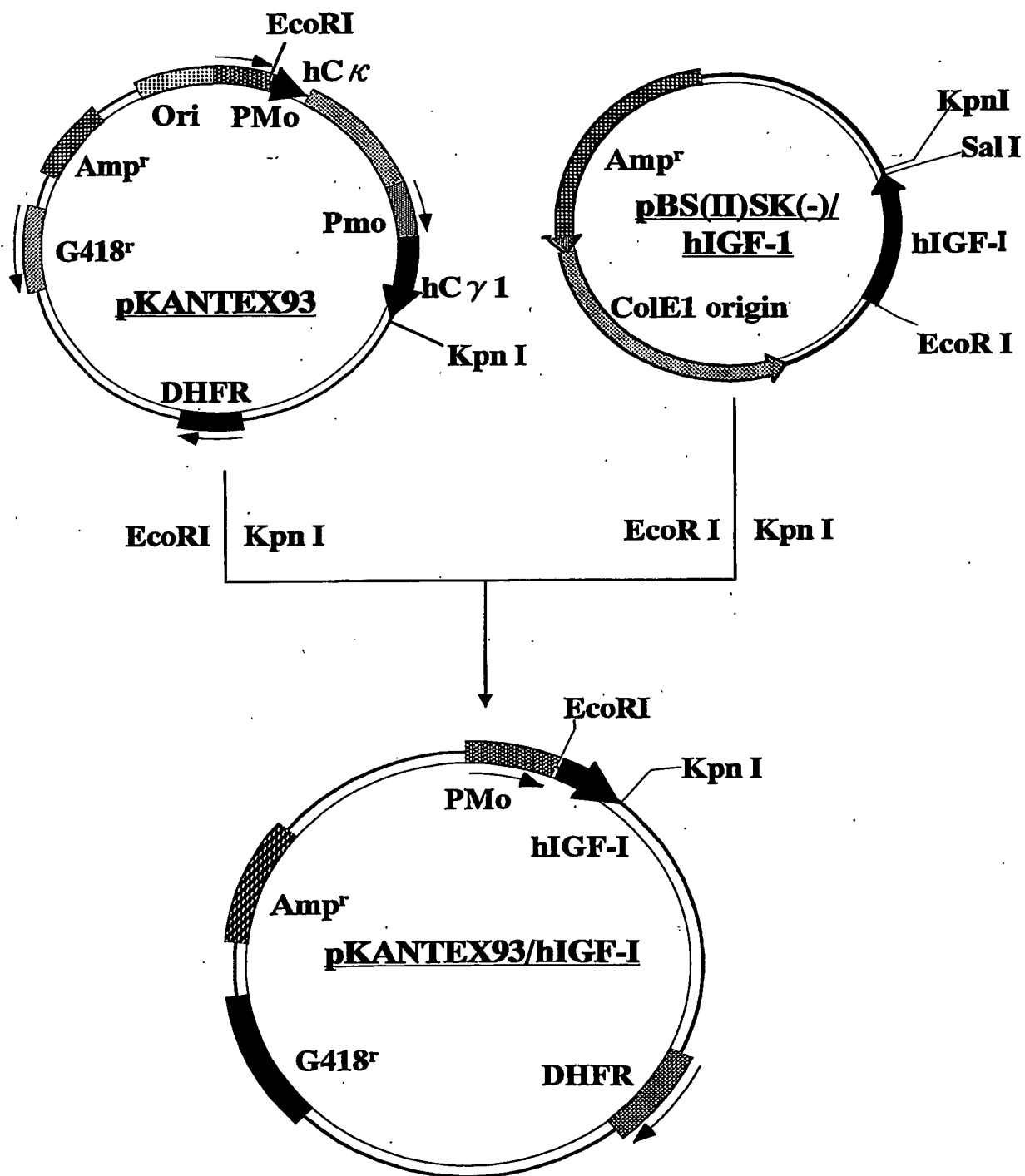


## 第10図



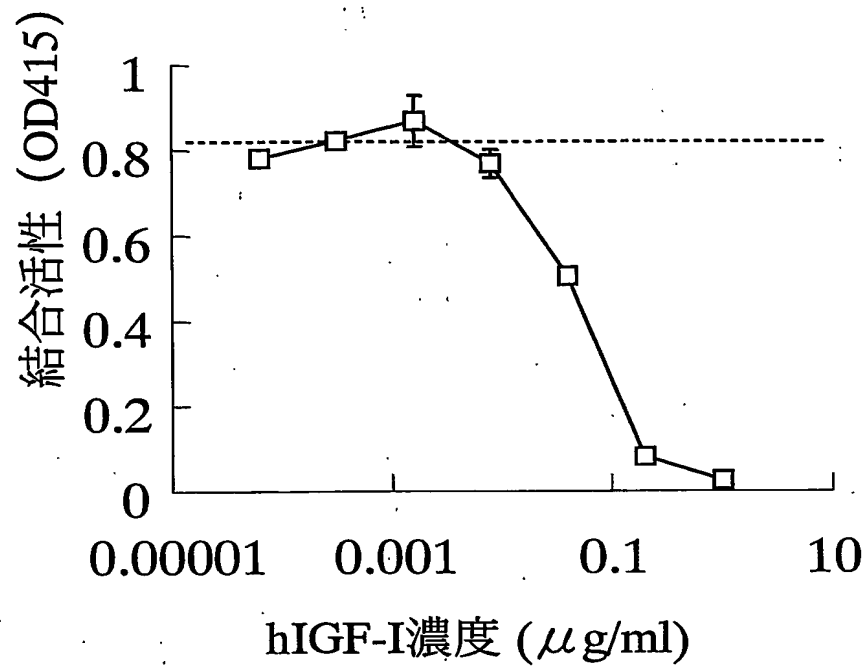


## 第11図

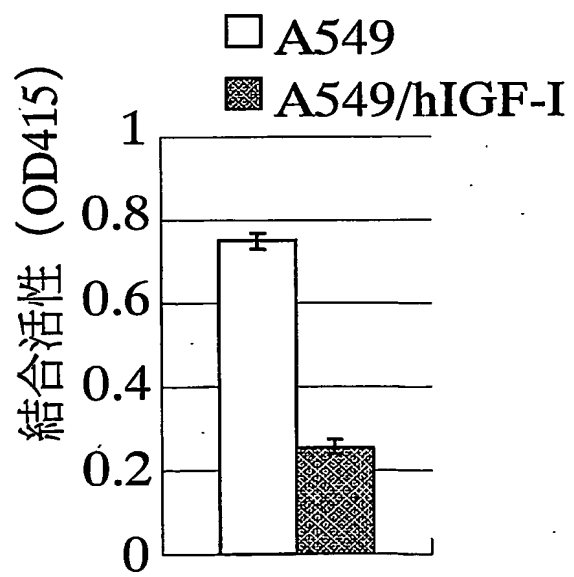


## 第12図

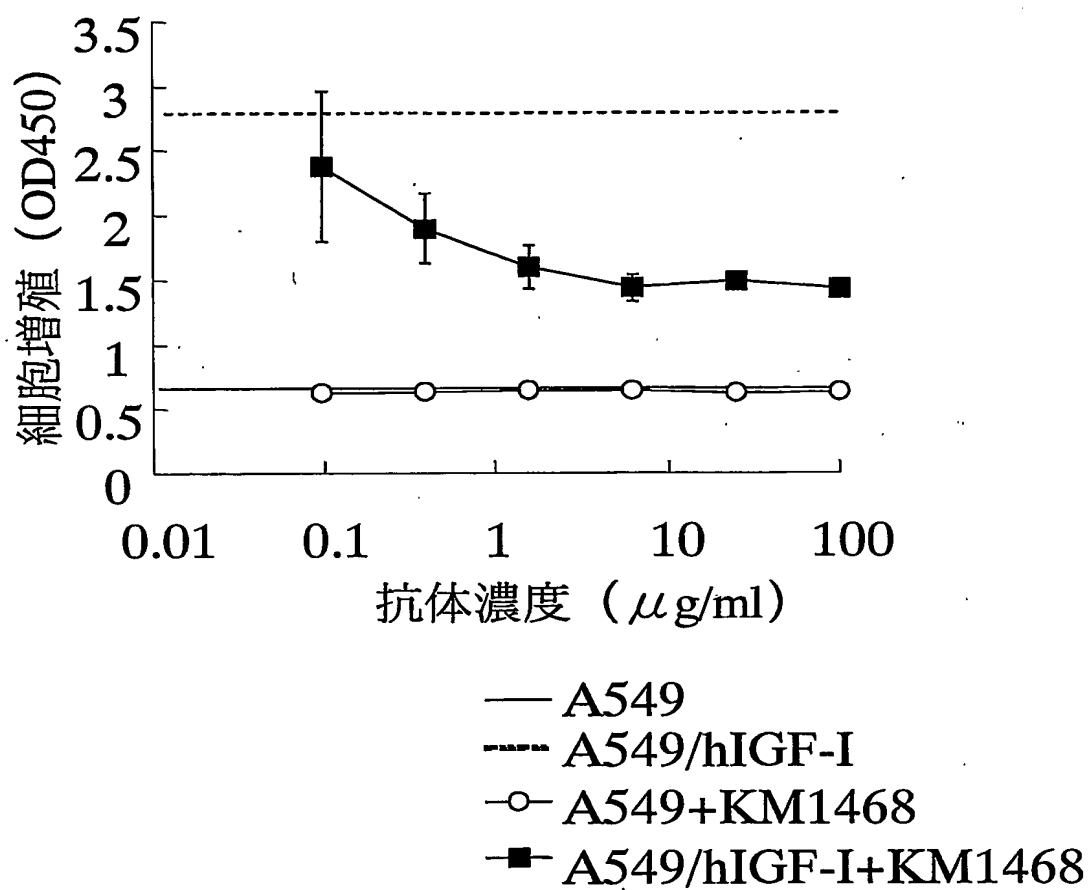
A



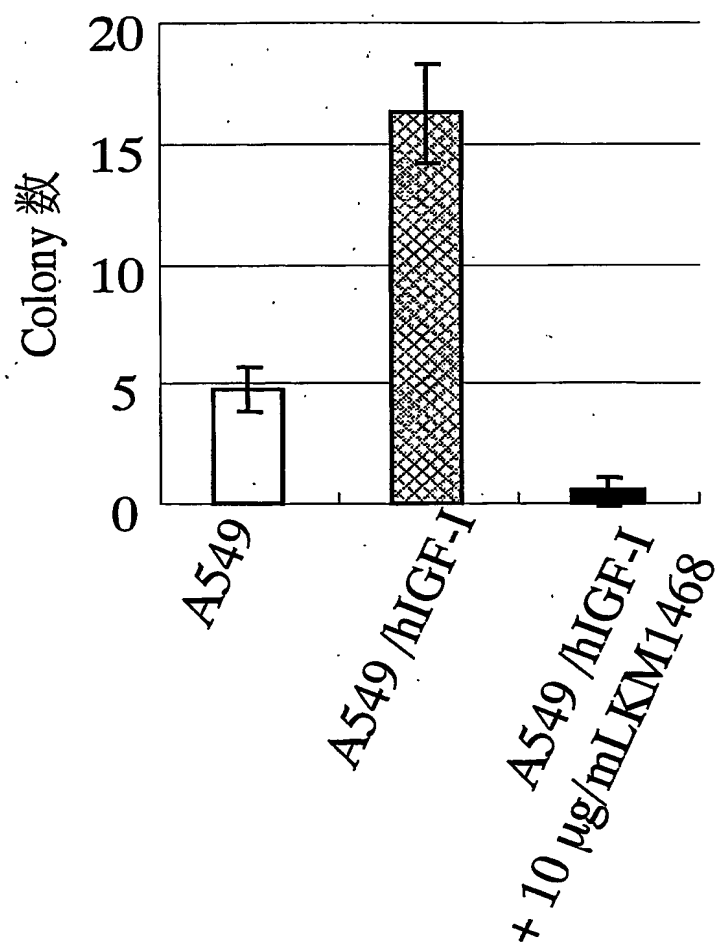
B



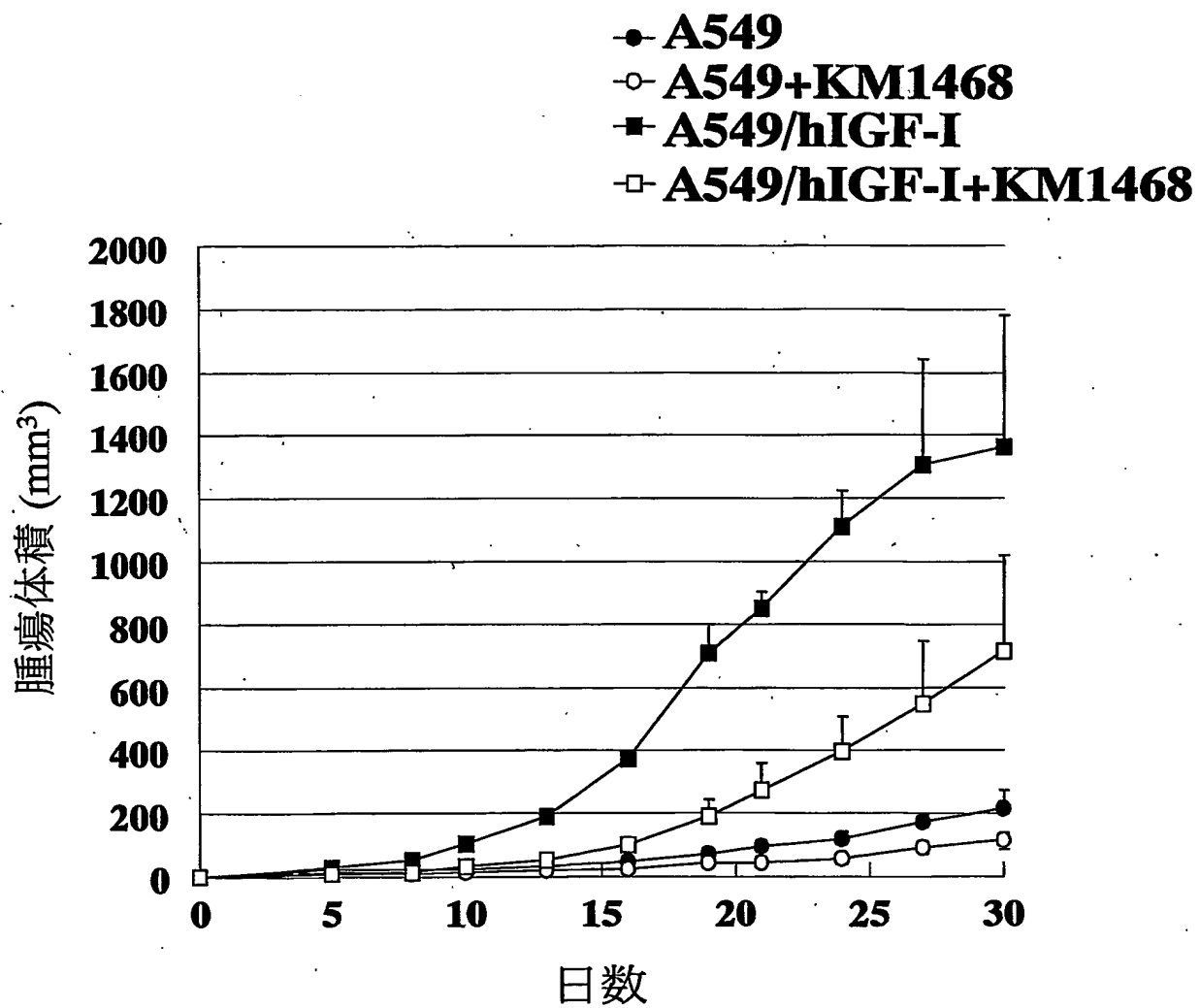
第13図



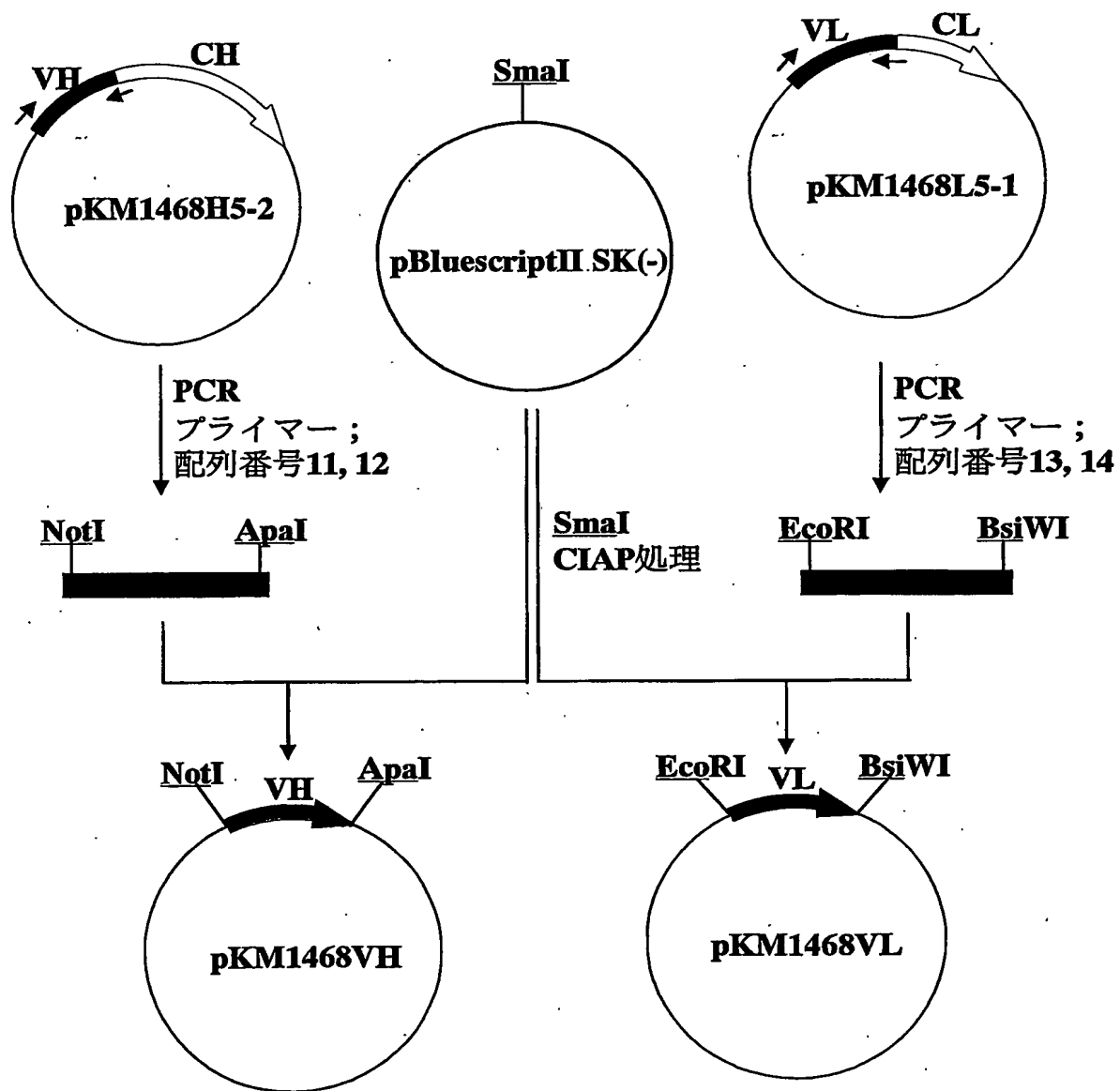
## 第14図



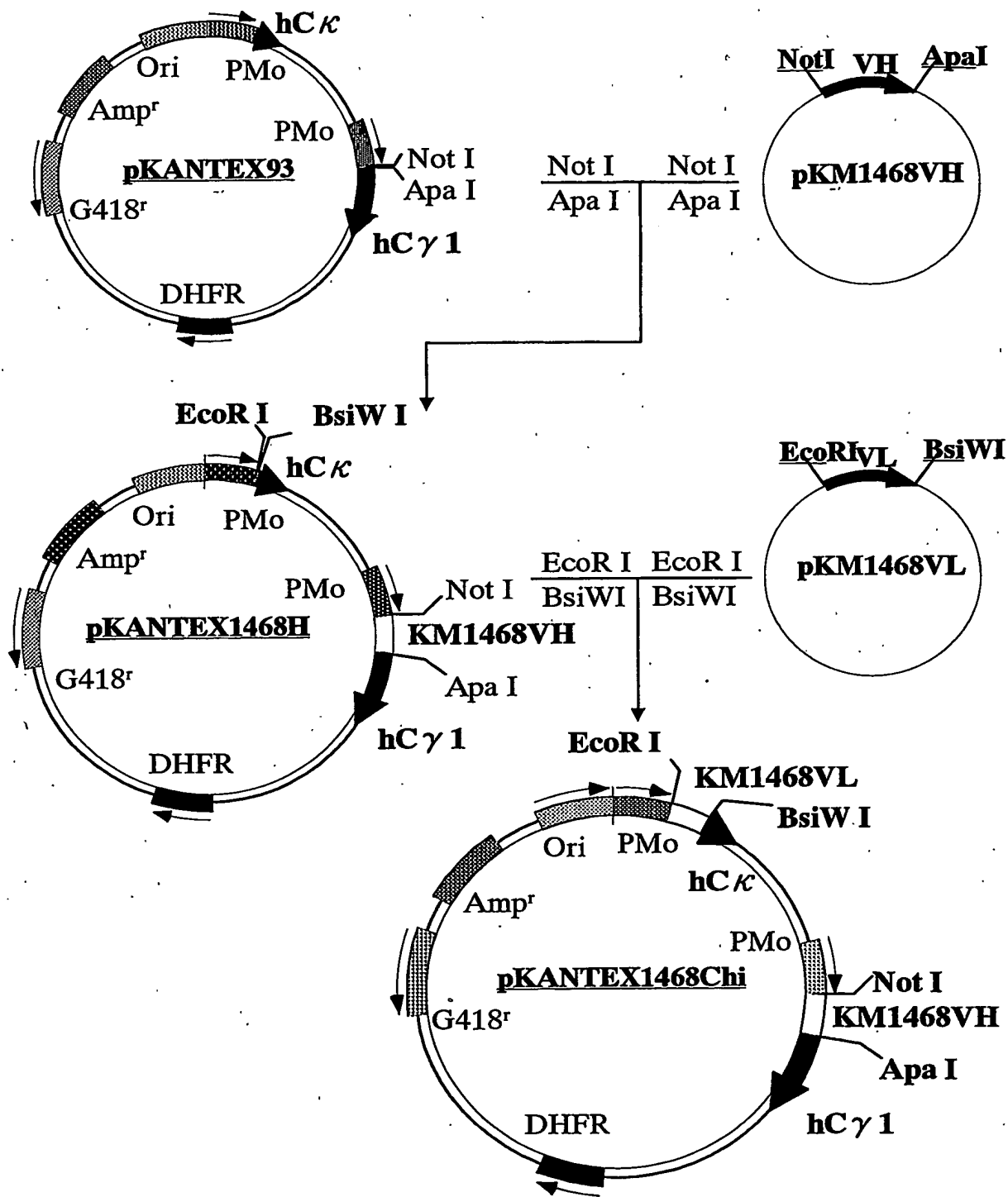
## 第15図



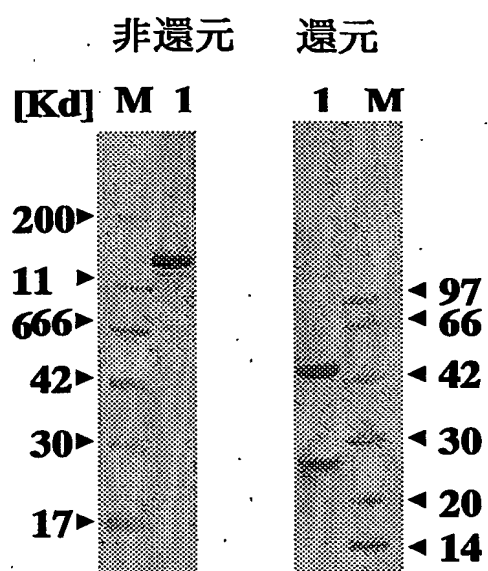
## 第16図



## 第17図

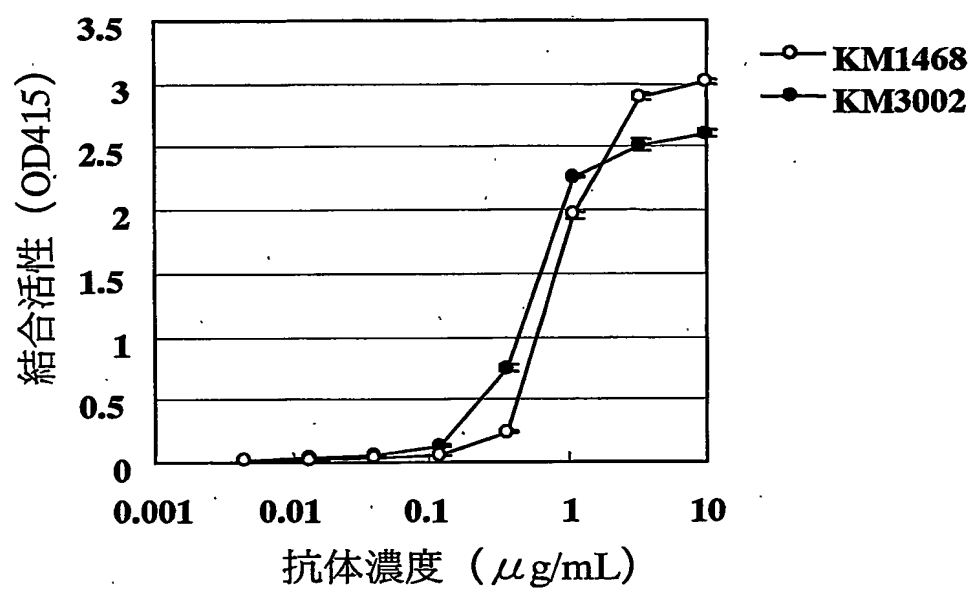


## 第18図





## 第19図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.

<120> Recombinant antibody against human insulin-like growth factors

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 411

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<400> 1

atg	gac	atc	agg	ctc	agc	ttg	gtt	ttc	ctt	gtc	ctt	ttc	ata	aaa	ggc	48
Met	Asp	Ile	Arg	Leu	Ser	Leu	Val	Phe	Leu	Val	Leu	Phe	Ile	Lys	Gly	
1				5				10					15			

gtc	cag	tgt	gag	gta	cac	ctg	gtg	gaa	tct	ggg	gga	ggc	tta	gtg	cag	96
Val	Gln	Cys	Glu	Val	His	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	
			20					25					30			

cct	gga	agg	tcc	ctg	aaa	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tca	gga	ttc	act	ttc	144
Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	
		35					40					45				

agt	aac	tat	tac	atg	acc	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	acg	aag	ggc	ctg	192
Ser	Asn	Tyr	Tyr	Met	Thr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Thr	Lys	Gly	Leu	
	50					55					60					

gag	tgg	gtc	gca	tac	att	agt	agt	ggc	ggc	ggc	agc	act	tac	tat	cga	240
Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Arg	
65					70					75					80	

gac	tcc	gtg	aag	ggc	cga	ttc	act	atc	tcc	aga	gat	aat	gca	aaa	agc	288
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser	

85                                      90                                      95  
 acc ctg tac ctg caa atg gac agt ctg agg tct gag gac acg gcc act 336  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr  
                     100                                      105                                      110  
  
 tat tac tgt aca aca gag gac tat ggg tat tgg ttt gct tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
                     115                                      120                                      125  
  
 caa ggc act ctg gtc act gtc tct tca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     130                                      135  
  
 <210> 2  
 <211> 137  
 <212> PRT  
 <213> Rattus norvegicus  
  
 <400> 2  
 Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly  
                     1                                      5                                      10                                      15  
  
 Val Gln Cys Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
                     20                                      25                                      30  
  
 Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
                     1                                      5                                      10                                      15  
  
 Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu  
                     20                                      25                                      30  
  
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg  
                     35                                      40                                      45  
  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser  
                     50                                      55                                      60  
  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr  
                     65                                      70                                      75                                      80  
  
 Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly

	85	90	95	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
100				
<p>&lt;210&gt; 3            &lt;211&gt; 384            &lt;212&gt; DNA            &lt;213&gt; Rattus norvegicus</p> <p>&lt;220&gt;            &lt;221&gt; CDS            &lt;222&gt; (1)..(387)</p> <p>&lt;400&gt; 3</p>				
atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca				48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr				
1 5 10 15				
gtc ata gtg tcc agt gga gaa att gtg ctc acc cag tct cca aca acc				96
Val Ile Val Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr				
20 25 30				
atg gct gca tct cca gga gag aag gtc acc atc acc tgc cgt gcc agc				144
Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser				
35 40 45				
tca agt gta agc tac atg cac tgg ttc cag cag aag tca ggc acc tcc				192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser				
50 55 60				
ccc aaa ccc tgg att tat ggc aca tcc aag ctg gct tct gga gtc cca				240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro				
65 70 75 80				
gat cgc ttc agt ggc agt ggg tct ggg acc tct tat tct ctc aca atc				288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile				
85 90 95				
agc tcc atg gag gct gaa gat gct gct act tat tac tgt ctg cag agg				336
Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg				
100 105 110				

agt agt tac cca ccc acg ttt gga gct ggg acc aag ctg gaa ctg aaa 384  
 Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
           115                          120                          125

<210> 4

<211> 128

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr  
       1                          5                          10                          15

Val Ile Val Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Thr  
                           20                          25                          30

Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser  
           35                          40                          45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser  
       50                          55                          60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
       65                          70                          75                          80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
                           85                          90                          95

Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg  
           100                          105                          110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
       115                          120                          125

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 5

Asn Tyr Tyr Met Thr

1

5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr

1

5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1

5

10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 10

Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr

1

5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 11

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20

25

30

Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 12  
 <211> 137  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 12  
 Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly  
     1                    5                    10                    15  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
                     20                    25                    30  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
                     35                    40                    45  
 Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
                     50                    55                    60  
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg  
                     65                    70                    75                    80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
                     85                    90                    95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
                     100                    105                    110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
                     115                    120                    125  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                     130                    135

<210> 13  
 <211> 411  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(411)



&lt;400&gt; 13

atg gac atc agg ctc agc ttg gtt ttc ctt gtc ctt ttc ata aaa ggt 48  
 Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly  
 1 5 10 15

gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtc gta cag 96  
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln  
 20 25 30

cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt 144  
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 35 40 45

agc aac tat tac atg acc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg 192  
 Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

gag tgg gtc gct tac att agt agt ggt ggt ggt agc act tac tat cga 240  
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg  
 65 70 75 80

gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
 85 90 95

acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta 336  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

tat tac tgt gcg aga gag gac tat ggg tat tgg ttt gct tac tgg ggc 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 115 120 125

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 411  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 14

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 15

Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr  
 1 5 10 15

Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser  
 20 25 30

Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
 50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80



	85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt ctg cag agg				336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg				
	100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa				384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys				
	115	120	125	
cgt acg ctc gag				396
Arg Thr Leu Glu				
	130			

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411).

&lt;400&gt; 17

atg gac atc agg ctc agc ttg gtt ttc ctt gtc ctt ttc ata aaa ggt	48
Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtc gta cag	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
20 25 30	
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt	144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	
agc aac tat tac atg acc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg	192
Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg gtc gct tac att agt agt ggt ggt ggt agc act tac tat cga	240
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg	

65	70	75	80	
gac tcc gtg aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac				288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn				
	85	90	95	
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gta				336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val				
	100	105	110	
tat tac tgt aca aca gag gac tat ggg tat tgg ttt gct tac tgg ggc				384
Tyr Tyr Cys Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly				
	115	120	125	
cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca				411
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	130	135		

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 411

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(411)

&lt;400&gt; 18

atg gac atc agg ctc agc ttg gtt ttc ctt gtc ctt ttc ata aaa ggt	48
Met Asp Ile Arg Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly	
1 5 10 15	
gtc cag tgt gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtc gta cag	96
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln	
20 25 30	
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt	144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
35 40 45	
agc aac tat tac atg acc tgg gtc cgc cag gct cca acg aag ggg ctg	192
Ser Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu	



35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca tct tat tct ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gct gca act tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
115	120	125	

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 20

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1	5
10	15

gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
20	25
30	

ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc aac tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser	

35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
	85	90	95
agc agc ctg cag gct gaa gat gct gca act tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
	100	105	110
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	115	120	125

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 21

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1	5
	10
	15

gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
	20
	25
	30

ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc acc tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	



35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gct gca act tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
115	120	125	

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 22

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1 5 10 15	
gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
20 25 30	
ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc acc tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	

35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag tcc	192		
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct	240		
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc	288		
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt ctg cag agg	336		
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa	384		
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
115	120	125	

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 23

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1	5
10	15
gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
20	25
30	
ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc acc tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	

35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca tct tat tct ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gct gca act tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
115	120	125	

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 24

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1	5
10	15

gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
20	25
30	

ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc aac tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser	

35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc ctc att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca tct tat tct ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
	85	90	95
agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
	100	105	110
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	115	120	125

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;400&gt; 25

atg gat ttt cag gtg cag agt ttc agc ctc ctg cta atc agt atc aca	48
Met Asp Phe Gln Val Gln Ser Phe Ser Leu Leu Leu Ile Ser Ile Thr	
1	5
	10
	15

gtc ata gtg tcc agt gga gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc	96
Val Ile Val Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser	
	20
	25
	30

ctg gct gtg tct cta ggc gag agg gcc acc atc aac tgc cgt gcc agc	144
Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser	

35	40	45	
tca agt gta agc tac atg cac tgg tac cag cag aaa cca gga cag tcc			192
Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
50	55	60	
cct aag ccc tgg att tac ggc aca tcc aag ctg gct tct ggg gtc cct			240
Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro			
65	70	75	80
gac aga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca tct tat tct ctc acc atc			288
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile			
85	90	95	
agc agc ctg cag gct gaa gat gtg gca gtt tat tac tgt ctg cag agg			336
Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg			
100	105	110	
agt agt tac cca cca acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa			384
Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Thr Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                             85                            90                            95

Thr Thr Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                             100                            105                            110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
                             115

<210> 27

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
   1                            5                            10                            15

Glu Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                             20                            25                            30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
                             35                            40                            45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
                             50                            55                            60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu  
                             65                            70                            75                            80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
                             85                            90                            95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                             100                            105

<210> 28

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

&lt;400&gt; 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 29

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 35 40 45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
                                     85                                    90                                    95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                                     100                                    105

<210> 30  
 <211> 150  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 30  
 aattaaccct cactaaaggg gaattcgagg ccgctctccc attcagtaat cagtcctgca 60  
 gcactgcaca gactcctcac catggacatc aggctcagct tggttttcct tgcctttttc 120  
 ataaaagggtg tccagtgtca ggtgcagctg 150

<210> 31  
 <211> 148  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 31  
 actccagccc cttccctgga gcctggcgga cccaggtcat gtaatagttg ctaaagggtga 60  
 atccagagge tgcacaggag agtctcaggg acctcccagg ctgtacgacg cctccccccag 120  
 actccaccag ctgcacctga cactggac 148

<210> 32  
 <211> 150  
 <212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 32

tccaggaag gggctggagt gggtcgctta cattagtagt ggtggtggta gcacttacta 60

tcgagactcc gtgaagggcc ggttcaccat ctccagagac aattccaaga acacgctgta 120

tctgcaaata aacagcctga gagccgagga 150

<210> 33

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 33

gaccgatggg cccttggtgg aggtgagga gacggtgacc agggttccct ggccccagta 60

agcaaaccaa taccatagat cctctctcgc acagtaatat acggccgtgt cctcggtctt 120

caggctgttc 130

<210> 34

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 34

aattaaccct cactaaagg gaattctcca aacttcaagt acacaatgga ttttcaggtg 60

cagagtttca gcctcctgct aatcagtatc acagtcatag tgtccagtgg agacatcgtg 120

atgaccagat ctccagactc cctggctgtg 150

<210> 35

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 35

ccccagaagc cagcttggat gtgccgtaaa tgagcagctt aggaggctgt cctggtttct 60  
gctggtacca gtgcatgtag cttacacttg agctggcacg gcagttgatg gtggccctct 120  
cgcctagaga cacagccagg gagtctggag 150

<210> 36

<211> 150

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 36

atccaagctg gcttctgggg tccctgacag attcagtggc agcgggtctg ggacagattt 60  
cactctcacc atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtctgcagag 120  
gagtagttac ccaccaacgt tcggccaagg 150

<210> 37

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 37

gtaatacgac tcactatagg gcctcgagcg tacgtttgat ttccaccttg gtcccttggc 60

cgaacgttgg tg

72

<210> 38

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 38

aattaaccct cactaaaggg gaattcgcg cgcctctccc attcagtaat cagtcctgca 60

gcactgcaca gactcctcac catggacatc aggctcagct tggttttcct tgccttttc 120

ataaaagggtg tccagtgtga gg

142

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 39

ccagcccctt cgttgagcc

20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 40

ggctccaacg aaggggctgg

20

<210> 41

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 41

gtacaacaga ggactatggg tattggttg ttactggg ccagggaacc ctggtcaccg 60

tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tc 92

<210> 42

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 42

ccagaagcca gcttggatgt gccgtaaatc cagggttag gggactgtcc 50

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 43

accatcacct gccgtgccag 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 44

gcacatccaa gctggcttct

20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 45

agaagccagc ttggatgtgc

20

<210> 46

<211> 142

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 46

aattaaccct cactaaagg gaattctcca aacttcaagt acacaatgga ttttcaggtg 60

cagagtttca gcctcctgct aatcagtatc acagtcatag tgtccagtg agacatcgtg 120

ctcaccagc ctccaacaac ca

142

<210> 47

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 47

tccagggctt aggggactgt cctggtttct gctggaacca gtgcatgtag cttacacttg 60

agctggcacg gcaggtgatg gtggccctct cgcctggaga cacagccatg gttgttggag 120

actgggtgag 130

<210> 48

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 48

gacagtcccc taagccctgg atttacggca catccaagct ggcttctggg gtccctgaca ou

gattcagtgg cagcgggtct gggacatctt attctctcac catcagcagc ctgcaggctg 120

aagatgctgc aac 133

<210> 49

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 49

gtaatacgac tcactatagg gcctcgagcg tacgtttgat ttccaccttg gtcccttggc 60

cgaacgttgg tgggtaacta ctctctgca gacagtaata agttgcagca tcttcagcct 120

gca 123

<210> 50

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 50

aaggggaatt ctccaaactt caagtacaca

30

<210> 51

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 51

agaagccagc ttggatgtgc cgtaaagtag gggcttaggg gactgtcctg

50

<210> 52

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 52

ggcagcgggt ctgggacatc ttattctctc accatcagca gcctg

45

<210> 53

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 53

agaagccagc ttggatgtgc cgtaaatacca gggcttaggg gactgtcctg gtttctgctg 60

gaaccagtg

69

<210> 54  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 54  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
     1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
             20                    25                    30  
 Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
             35                    40                    45  
 Ser Tyr Ile Ser Ser Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Arg Asp Ser Val  
             50                    55                    60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
             65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                     85                    90                    95  
 Ala Arg Glu Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
             100                    105                    110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
             115

<210> 55  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<400> 55  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
     1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
             20                    25                    30



His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
                   35                                  40                                  45

Gly Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
           50                                  55                                  60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
   65                                  70                                  75                                  80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr  
                                   85                                  90                                  95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                                  105

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Pro Glu Thr Leu Ser Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe  
   1                                  5                                  10                                  15

Val Cys

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Cys Leu Gln Phe Val Ala Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro  
   1                                  5                                  10                                  15

Thr Gly

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Cys Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser  
1 5 10

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Cys Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr  
1 5 10

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys  
1 5 10

<210> 61

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Ala Ala Phe Arg Ser Ala Asp Leu Arg  
1 5 10 15

Arg

<210> 62

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Ala Ala Pro Leu Lys Pro Ala  
1 5 10 15

Lys Ser Ala

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys  
1 5

<210> 64

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Lys Ser Ala  
1 5

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Cys Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg  
1 5 10 15

Arg

<210> 66

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 66

gatgaattca gaagcaatgg gaaaaatcag cagtc

35

<210> 67

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 67

cattgtcgac gcatgtcact cttcactcct ca

32

<210> 68

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 68

taaagaattc gcggccgctc tccc

24

<210> 69

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 69

taaagtcgac gggcccttgg tggaggctga agagacagt accagagt

49

<210> 70  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 70  
taaagaattc tccaaacttc aagtacacaa tgg 33

<210> 71  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 71  
taaagtcgac cgtacgtttc agttccagct tggtc 35

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014453

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/26, C12N15/13, C21N1/21, C21N1/19, C21N1/15, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395, A61P3/10, A61P5/06, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/26, C12N15/13, C21N1/21, C21N1/19, C21N1/15, C12N5/10, C12P21/08, A61K39/395, A61P3/10, A61P5/06, A61P35/00, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/ GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	RUSSELL, W.E. et al., Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C., Proc.Natl.Acad. Sci.USA., 1984, Vol.81, No.8, pages 2389 to 2392	<u>1-5, 20-28</u> 6-19
P, X	GOYA, M. et al., Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors., Cancer Res., 01 September, 2004 (01.09.04), Vol.64, No.17, pages 6252 to 6258	1-28

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
09 December, 2004 (09.12.04)

Date of mailing of the international search report  
28 December, 2004 (28.12.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/014453

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 03/093317 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 13 November, 2003 (13.11.03), & AU 2003231554 A1	1-28
P,X	JP 2003-310275 A (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 05 November, 2003 (05.11.03), (Family: none)	1-28

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/26, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 3/10, A61P 5/06, A61P 35/00, G01N 33/15, G01N 33/50

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 16/26, C12N 15/13, C12N 1/21, C12N 1/19, C12N 1/15, C12N 5/10, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 3/10, A61P 5/06, A61P 35/00, G01N 33/15, G01N 33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	RUSSELL, W. E. et al. Inhibition of the mitogenic effects of plasma by a monoclonal antibody to somatomedin C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984, Vol. 81, No. 8, p. 2389-2392	1-5, 20-28 6-19
P, X	GOYA, M. et al. Growth inhibition of human prostate cancer cells in human adult bone implanted into nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice by a ligand-specific antibody to human insulin-like growth factors. Cancer Res. 2004. Sep. 1, Vol. 64, No. 17, p. 6252-6258	1-28

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.12.2004

国際調査報告の発送日

28.12.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) : 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	WO 03/093317 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2003. 11. 13 & AU 2003231554 A1	1-28
P, X	JP 2003-310275 A (協和醗酵工業株式会社) 2003. 11. 05 (ファミリーなし)	1-28